

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
Departamento de Química e Bioquímica



Espectrometria de massa aplicada ao estudo da reacção de Maillard

Marco António Gomes Saraiva

Doutoramento em Química
(Química analítica – Espectrometria de massa)

Lisboa, 2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Química e Bioquímica



Espectrometria de massa aplicada ao estudo da reacção de Maillard

O trabalho de investigação, de que se ocupa a presente dissertação, foi realizado no laboratório de espectrometria de massa & cromatografia – II, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob a orientação da *Professora Doutora Maria Helena Ferreira da Silva Florêncio* e co-orientação do *Professor Doutor Carlos Manuel Ferreira de Sousa Borges*.

Marco António Gomes Saraiva

Doutoramento em Química

(Química analítica – Espectrometria de massa)

Lisboa, 2007

Agradecimentos.

Na realização deste trabalho muitas foram as pessoas, e “não pessoas”, que contribuíram, directa ou indirectamente, para o seu bom curso.

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade de Lisboa e à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa pelo acolhimento do trabalho de Doutoramento que resultou na elaboração da presente dissertação. Agradeço ainda à Fundação para a Ciência e a Tecnologia do Ministério da Ciência e do Ensino Superior pelo financiamento.

O trabalho, de que se ocupa a presente dissertação, foi realizado no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob a orientação da Professora Doutora Helena Florêncio e co-orientação do Professor Doutor Carlos Borges. Relativamente à pessoa da Professora Helena Florêncio, tenho a agradecer profundamente o seu entusiasmo e o seu interesse no trabalho desenvolvido, bem como a sua persistência e dinamismo, que também muito contribuíram para o meu crescimento profissional. Em adição, expresso a minha franca gratidão pela compreensão da Professora Helena Florêncio, pelo seu suporte e apoio, e até mesmo pela sua palavra amiga. O meu muito obrigado. Na pessoa do Professor Carlos Borges, gostaria de agradecer pelo seu auxílio na parte de execução experimental e nas questões de operacionalidade do instrumento de massas. Não posso deixar de agradecer a sua boa disposição, o seu suporte e preocupação.

Tenho a agradecer ao Doutor Carlos Cordeiro e à Professora Doutora Ana Ponces Freire pela sugestão do tema do trabalho de investigação e pela orientação e auxílio prestados nas primeiras experiências laboratoriais. Gostaria de agradecer o muito bom acolhimento do grupo de enzimologia, e pelos momentos divertidos que se proporcionaram no grupo. Tenho forçosamente de agradecer os ensinamentos do Doutor Carlos, que se compreendem a diversos níveis, desde na execução experimental a critérios mais alargados. Ao Ricardo e à Marta Silva, agradeço muito o seu apoio e palavra amiga. Que tudo vos corra sempre pelo melhor! Desde já agradeço, também, ao Luís e ao Hugo, também elementos do grupo de enzimologia.

O meu agradecimento recai também sobre a Professora Doutora Susana Santos, pela sua disponibilidade, prontidão, e pelo auxílio prestado, na execução de algumas experiências na sua área de especialidade.

No grupo de espectrometria de massa ambiental e biológica, gostaria de agradecer à Professora Doutora Tereza Fernandez pela sua seriedade e boa disposição, e por alguns acontecimentos relatados sobre o seu percurso académico, que, pelo menos, a mim, me animavam bastante. Um agradecimento à Professora Doutora Filomena Duarte.

Às pessoas da salinha, que são muitas, quero expressar o meu agradecimento sobre o seu contributo para o meu crescimento como pessoa. Gostaria de agradecer também o auxílio prestado e pelos momentos divertidos que passamos juntos.

Queria agradecer ao Luís Moreira pela sua amizade e ao grupo de estrutura e reactividade química, à Carmo pelas conversas várias e pelos momentos de franca diversão. Um agradecimento particular à América, pela sua simpatia.

Agradeço ainda a outras pessoas que me ajudaram neste percurso, dentro e fora da Faculdade, e que foram várias. Dra. Alexandre e Guiomar, muito obrigado! À amizade da Eduarda e do Jorge. Um agradecimento muito especial à Ana Sílvia e ao Carlos, pela sua amizade e hospitalidade.

Resta-me, embora não menos importante, agradecer à minha família mais estrita. À minha mãe agradeço, uma vez que as palavras não servem para estes momentos. Um agradecimento ao meu irmão.

Resumo.

A reacção de Maillard tem a sua bem reconhecida importância no campo da química alimentar e, mais recentemente, *in vivo*. Os grupos amina de aminoácidos, como a lisina e a arginina, têm um destaque particular ao nível da reacção de Maillard, dada a sua importante reactividade. Apesar da referida reacção respeitar às modificações dos grupos amina de aminoácidos com os açúcares redutores, tem-se verificado que, no decurso da reacção, se formam espécies dicarbonílicas, mais reactivas que os açúcares de partida, isto ao nível de quase todas as etapas da referida reacção. Tendo atenção que os compostos α -dicarbonilo são extremamente reactivos e francamente versáteis na sua reactividade com os grupos amina de aminoácidos, optou-se neste trabalho de investigação por se estudar as reacções dos aminoácidos modificados, acetil-lisina e acetil-arginina, e formas derivadas destes compostos, como a guanidina e a aminoguanidina, com um conjunto de α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos. Tendo em consideração que a espectrometria de massa de ionização por electrospray (ESI-MS) é uma técnica extremamente vantajosa para o estudo de processos reactivos em solução, em particular para matrizes de compostos relativamente simples, recorreu-se a esta técnica e à espectrometria de massa *tandem* para a identificação e caracterização das espécies moleculares intervenientes nas reacções dos compostos amina com os α -dicarbonilos seleccionados. Na base da metodologia adoptada foi investigado o processo de formação de iões na fase gasosa, segundo as condições usadas em ESI-MS, e também foram estudados alguns detalhes do mecanismo de ionização por electrospray, em particular no que respeita ao comportamento observado em alguns dos componentes das misturas reaccionais em questão. Ao nível das misturas reaccionais, os produtos de reacção identificados com base na análise ESI e alguma informação relativa às suas reacções de formação permitiram concluir que os resultados são francamente concordantes com os da literatura, em particular para os sistemas reaccionais mais investigados. Neste trabalho, em geral, reuniu-se um importante conjunto de informação mecanística para as reacções em questão, com o estabelecimento de algumas considerações para os processos de glicação relacionados. Nestes últimos processos e nos estudados neste projecto, a reacção de Maillard encontra-se francamente mais bem compreendida, e com um destaque particular no contexto actual da reacção de Maillard *in vivo*.

Abstract.

The importance of the Maillard reaction, in the food chemistry area, and, more recently, *in vivo*, has long been recognized. The amino groups of amino acids, such as those in lysine and arginine, play a particular role in the Maillard reaction due to their enhanced reactivity. Although the Maillard reaction is formerly known as the reaction of amino acids amino groups with reducing sugars, it has been noted that dicarbonylic species are formed in the course of the reaction, and they are also more reactive than the starting reducing sugars. In fact, these mentioned dicarbonylic species are known to be formed in every stage of the Maillard reaction. Considering that α -dicarbonyl compounds are extremely reactive and versatile species in their reaction with amino acids amino groups, in this dissertation the reactions of the blocked amino acids, acetyl-lysine and acetyl-arginine, and derivatives, such as guanidine and aminoguanidine, with selected aldehydic and diketonic α -dicarbonyls, were investigated. Since electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is becoming a suitable tool for studying chemical processes in solution, especially those that do not offer great complexity, this technique, together with *tandem* mass spectrometry were used, to identify and characterize intervenient molecular species in the reactions of amino compounds with the selected α -dicarbonyls. Within the methodology used, the conversion process of solution ions into gas phase isolated ionized entities, under ESI-MS conditions, was investigated, and details from the electrospray mechanism were also studied, with respect to the observed behaviour of some components of the reactions mixtures in question. In reaction mixtures investigations, the identified reaction products, under ESI-MS, and some information concerning their formation, led to conclude that the results here obtained are in good agreement with literature ones, for the reaction systems more investigated, especially. In the overall, in the present study, a significant amount of mechanistic information was obtained for the reaction systems in question. This information also allowed taking some considerations for related glycation processes, since these processes and the ones investigated here are certainly better understood, in terms of the Maillard reaction chemistry, having also a particular role in the actual context of the Maillard reaction *in vivo*.

Palavras-chave/Keywords.

Palavras-chave:

Reacção de Maillard; aminoácidos básicos e derivados; α -dicarbonilos; espectrometria de massa de ionização por electrospray; espectrometria de massa *tandem*; glicação.

Keywords:

Maillard reaction; basic amino acids and derivatives; α -dicarbonyls; electrospray ionization mass spectrometry; *tandem* mass spectrometry; glycation.

Índice.

Agradecimentos.	i
Resumo.	iii
Abstract.	iv
Palavras-chave/Keywords.	v
Índice.	vii
Símbolos e abreviaturas.	xv

Capítulo I

1. Introdução geral.	1
1.1. Importância da reacção de Maillard?	2
1.2. Porquê recorrer a técnicas de espectrometria de massa para o estudo da reacção de Maillard?	5
1.3. Objectivo e estrutura da dissertação.	7
1.4. Bibliografia.	10

Capítulo II

2. Reacção de Maillard.	13
2.1. Introdução.	13
2.2. Reacção de Maillard na química alimentar.	17
2.3. Reacção de Maillard <i>in vivo</i> .	21
2.3.1. Química e vias reaccionais envolvidas na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs).	24
2.3.1.1. Produto Amadori.	29
2.3.1.2. Autooxidação da glucose.	30
2.3.1.3. Via reaccional poliólica.	30
2.3.1.4. Produtos finais da glicação avançada (AGEs).	31
2.3.1.5. Formação de AGEs via açúcares redutores.	32
2.3.1.5.1. O artefacto FFI.	32
2.3.1.5.2. Pirralina e formas associadas.	34
2.3.1.5.3. Pentodisina.	37
2.3.1.5.4. CML e CEL.	40

2.3.1.5.5. Crosslines e vesperlisinas.	46
2.3.1.5.6. Glucosepano, pentosinano, DOGDIC e DOPDIC. Reinvestigação do AGE pentosidina.	48
2.3.1.5.7. GOLLA e GALA. Reinvestigação do AGE CML.	53
2.3.1.5.8. Desaminação oxidativa. Reacção de Strecker <i>in vivo</i> .	56
2.3.1.6. Formação de AGEs via trioses, α -dicarbonilos e outros compostos carbonílicos de baixa massa molecular.	60
2.3.1.6.1. Hidroimidazolona e 5-metilimidazolona, derivadas para o metilglioxal.	60
2.3.1.6.2. MOLD e GOLD.	62
2.3.1.6.3. Argpirimidina.	66
2.3.1.6.4. Tetrahidropirimidina (THP) e reinvestigação do composto 5-metilimidazolona.	69
2.3.1.6.5. Reinvestigação de AGEs: α NFC-1, β NFC-1 e γ NFC-1.	71
2.3.1.6.6. CMA.	73
2.3.1.6.7. Reinvestigação de AGEs: Dihidroxiimidazolidina, hidroimidazolona e CMA, derivados para o glioxal.	74
2.3.1.6.8. Triosidinas.	76
2.3.1.6.9. Dihidropiridina.	81
2.3.1.6.10. Outros <i>cross-links</i> . Relevância do produto Amadori no <i>cross-linking</i> .	82
2.3.2. Controlo e inibição da reacção de Maillard <i>in vivo</i> .	84
2.3.3. Métodos analíticos para identificação, caracterização e localização de produtos da reacção de Maillard <i>in vivo</i> .	85
2.4. Conclusões.	88
2.5. Bibliografia.	92

Capítulo III

3. Espectrometria de massa.	103
3.1. Introdução.	103
3.2. Fonte de ionização.	105
3.2.1. Fonte de electrospray.	106
3.2.1.1. Características operacionais da fonte de electrospray.	110

3.2.1.2. Teoria e mecanismo de electrospray.	112
3.2.1.2.1. Produção de gotas carregadas na agulha de electrospray. Fonte de electrospray como célula electroquímica.	115
3.2.1.2.2. Caracterização da fonte de electrospray como célula electroquímica a corrente controlada (CCE).	119
3.2.1.2.3. Evolução das gotas carregadas e formação de iões na fase gasosa.	125
3.2.1.2.4. Dependência da sensibilidade em ESI-MS da natureza química do analito, da sua concentração e da presença de outras espécies de electrólitos.	130
3.3. O analisador.	155
3.3.1. Analisador ion trap quadrupolar.	156
3.3.1.1. Características operacionais do analisador ion trap quadrupolar.	158
3.3.1.1.1. Regiões de estabilidade da trajectória do ião.	162
3.3.1.1.2. Frequências de ressonância dos iões.	163
3.3.1.1.3. Funções <i>Scan</i> e diagramas temporais.	164
3.3.1.1.4. Efeitos da velocidade de <i>scan</i> .	168
3.3.1.1.5. Efeitos carga-espaco.	169
3.3.1.1.6. Efeitos do gás de hélio (gás travão).	170
3.3.2. ‘Acoplamento’ electrospray-ion trap quadrupolar.	171
3.3.2.1. Reacções ião-molécula.	174
3.3.2.2. Detecção de iões ejectados.	175
3.4. Bibliografia.	177
 Capítulo IV	
4. Materiais e métodos.	183
<i>soluções de analitos</i>	
4.a1. Materiais.	184
4.a2. Preparação das soluções dos compostos aminoácido e amina.	184
<i>Misturas reaccionais</i>	
4.b1. Materiais.	184

4.b2. Síntese do α -dicarbonilo metilglioxal.	185
4.b3. Preparação das misturas reacionais.	185
4.1. Análise ESI-MS e ESI-MS ⁿ .	186
Bibliografia.	190
 Capítulo V	
5. Comportamento de analitos com características ácido/base distintas na presença do tampão não volátil HEPES. Um estudo por ESI-MS.	191
5.1. Objectivos.	192
<i>Manuscrito: Behaviour of analytes with different acid/base chemistry in the presence of the non-volatile HEPES buffer. An ESI-MS study.</i>	194
ABSTRACT	194
INTRODUCTION	196
EXPERIMENTAL	199
RESULTS AND DISCUSSION	202
CONCLUSIONS	226
ACKNOWLEDGMENTS	228
REFERENCES	229
5.2. Conclusões.	231
5.3. Bibliografia.	236
 Capítulo VI	
6. Reacções de uma lisina modificada com compostos α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos: um estudo de estrutura/actividade por espectrometria de massa de electrospray.	237
6.1. Objectivos.	239
<i>Manuscrito: Reactions of a modified lysine with aldehydic and diketonic dicarbonyl compounds: an electrospray mass spectrometry structure/activity study.</i>	240
ABSTRACT	240
INTRODUCTION	240
EXPERIMENTAL	242
RESULTS AND DISCUSSION	243

CONCLUSIONS	250
ACKNOWLEDGMENTS	250
APPENDIX	250
REFERENCES	251
6.2. Conclusões.	253
6.3. Bibliografia.	255
Capítulo VII	
7. Reacções da acetil-arginina com α -dicarbonilos.	257
7.1. Um estudo compreensivo sobre a reactividade de uma arginina modificada com compostos dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos por espectrometria de massa de electrospray.	257
7.1.1. Objectivos.	257
<i>Manuscrito: Non-enzymatic model glycation reactions – a comprehensive study of the reactivity of a modified arginine with aldehydic and diketonic dicarbonyl compounds by electrospray mass spectrometry.</i>	259
ABSTRACT	259
INTRODUCTION	259
EXPERIMENTAL	261
RESULTS AND DISCUSSION	262
CONCLUSIONS	271
ACKNOWLEDGMENTS	272
REFERENCES	272
7.1.2. Conclusões.	275
7.1.3. Bibliografia.	278
7.2. Um estudo de espectrometria de massa de electrospray para as reacções da acetil-arginina com α -dicarbonilos dicetónicos – evidência para uma modificação específica da arginina.	279
7.2.1. Objectivos.	281
<i>Manuscrito: An electrospray mass spectrometry based study of acetyl-arginine reactions with diketonic α-dicarbonyls – evidence</i>	

<i>for a specific arginine modification.</i>	282
ABSTRACT	282
INTRODUCTION	284
EXPERIMENTAL	287
RESULTS AND DISCUSSION	290
CONCLUSIONS	302
ACKNOWLEDGMENTS	303
REFERENCES	304
7.2.2. Conclusões.	306
7.2.3. Bibliografia.	308
 Capítulo VIII	
8. Reacções da guanidina com α -dicarbonilos.	311
8.1. Objectivos.	311
<i>Manuscrito: Towards the control and inhibition of glycation – the role of the guanidine reaction center with aldehydic and diketonic dicarbonyls. A mass spectrometry study.</i>	312
ABSTRACT	312
INTRODUCTION	312
EXPERIMENTAL	315
RESULTS AND DISCUSSION	315
CONCLUSIONS	333
ACKNOWLEDGMENTS	334
REFERENCES	334
8.2. Conclusões.	336
8.3. Bibliografia.	342
 Capítulo IX	
9. Reacções da aminoguanidina com α -dicarbonilos.	343
9.1. Objectivos.	345

<i>Manuscrito: Reactions of aminoguanidine with α-dicarbonyl compounds. An electrospray ionization mass spectrometry based study.</i>	346
ABSTRACT	346
INTRODUCTION	348
EXPERIMENTAL	352
RESULTS AND DISCUSSION	355
CONCLUSIONS	379
ACKNOWLEDGMENTS	381
REFERENCES	382
9.2. Conclusões.	384
9.3. Bibliografia.	387
 Capítulo X	
10. Discussão geral, conclusões e perspectivas futuras.	389
Bibliografia.	404
 Anexo	 a

Símbolos e abreviaturas.

AcArg	N_{α} -acetil-L-arginina (<i>N_{α}-acetyl-L-arginine</i>)
AcLys	N_{α} -acetil-L-lisina (<i>N_{α}-acetyl-L-lysine</i>)
AGE	Produto da glicação avançada (<i>advanced glycation end product</i>)
AIR	Modelo da distribuição iónica do aerosol (<i>aerosol ionic distribution model</i>)
A_j	Concentração de espécies j oxidadas e reduzidas
AMP	Produto Maillard avançado (<i>advanced Maillard product</i>)
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (<i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
aq	Aquoso
a_z e q_z	Parâmetros da equação de Mathieu
BOC	t -Butilóxicarbonilo
BSA	Albumina do soro bovino (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Concentração
CCE	Célula electrolítica a corrente controlada (<i>controlled-current electrolytic cell</i>)
CEA	N_{ω} -carboxietilarginina
CEL	N_{α} -(carboxietil)lisina
C_g	Concentração analítica do ião g
CHAPS	Ácido 3-[(3-colamidopropil)dimetilamónio]-propanosulfónico
CI	Ionização química (<i>chemical ionization</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>collision induced dissociation</i>)

CMA	N_{ω} -carboximetilarginina
cmc	Concentração micelar crítica
CML	N_{α} -(carboximetil)lisina
CMV	N_{α} -(carboximetil)valina
CRM	Modelo de carga residual (<i>charge residual model</i>)
CZE-MS	Electroforese capilar de zona acoplada à espectrometria de massa (<i>capillary zone electrophoresis coupled to mass spectrometry</i>)
d	Distância da agulha de electrospray ao contra-eléctrodo
Da	Dalton
dc	Corrente contínua
DDH	Dideoxihexosulose
DETAPAC	Ácido dietilenotriaminapentaacético (<i>diethylenetriaminepentaacetic acid</i>)
DH	Deoxihexosulose
DMA	Analizador de mobilidade diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
3-DOG e 3-DOP	Derivados de deoxiosona
DOGDIC	Dímero de lisina-arginina, com formação de imidazolidina, para a glicose
DOPDIC	Dímero de lisina-arginina, com formação de imidazolidina, para a frutose
e	Carga sobre o ião
e^{-}	Electrão
EA	Ácido eritrónico (<i>eritronic acid</i>)
E_{ES}	Campo eléctrico criado na agulha de electrospray
$E_{E/S}$	Potencial na interface eléctrodo de trabalho/solução

EH-MS	Espectrometria de massa electrohidrodinâmica (<i>electrohydrodynamic mass spectrometry</i>)
EI	Ionização electrónica (<i>electron ionization</i>)
ELISA	Teste imunoenzimático que permite a detecção de anticorpos específicos no soro (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
E_{red}^0	Potencial normal de redução
ESI-MS	Espectrometria de massa de ionização por electrospray (<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>)
f	Fracção de cargas na gota que foram convertidas em iões na fase gasosa
F	Constante de Faraday
FAB	Bombardeamento por átomos rápidos (<i>fast atom bombardement</i>)
FD	Desorção por campo (<i>field desorption</i>)
FFI	2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1 <i>H</i> -imidazolo
fFL	N_{α} -formil- N_{ϵ} -frutoselisina
f_h	Componente da frequência para o movimento do ião
f_{rf}	Frequência da voltagem rf aplicada
$f_{\text{z-res}}$	Frequência de ressonância fundamental para um ião
g	Gasoso
GC	Cromatografia gasosa (<i>gas chromatography</i>)
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (<i>gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
G-DH	Dihidroimidazolidina derivada para o glioxal
Glarg	Hidroimidazolona derivada para o glioxal
GLO	Glucosona

GODIC	Dímero de lisina-arginina derivado para o glioxal
GOLA e GALA	Amidas de lisina, derivadas para o glioxal
GOLD	Dímero de lisina derivado para o glioxal
Gua	Guanidina
H	Constante cujo valor depende da constante dielétrica e da tensão superficial do solvente
Hb	Hemoglobina
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfónico
HMF	Hidroxifurfural
HNE	Hidroxinonenal
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>high performance liquid chromatography</i>)
HSA	Albumina do soro humano (<i>human serum albumin</i>)
I	Corrente/Abundância iónica relativa
IEM	Modelo de evaporação iónica (<i>ion evaporation model</i>)
i_{ES}	Corrente de electrospray (i.e. a corrente na célula electrolítica)
i_F	Corrente de Faraday do eléctrodo de trabalho na célula electrolítica
I_{total}	Abundância iónica total
k	Coeficiente que traduz a “eficiência” relativa com que as espécies iónicas em solução são convertidas em iões na fase gasosa, em ESI-MS
K	Conductividade da solução
K	Coeficiente de equilíbrio de partição
k_{Ij}	Contante de evaporação dos iões j
K_{Sj}	Constante relativa ao equilíbrio dos iões j , no seio e na superfície da gota
l	Líquido

LC-ESI-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa de ionização por electrospray (<i>liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (<i>liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
LD	Desorção por laser (<i>laser desorption</i>)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
LL	ácido láctico 3-(N _ε -lisino)
<i>m</i>	Massa do ião
MALDI	Ionização/desorção laser assistida por matriz (<i>matrix assisted laser desorption ionization</i>)
MDA	Malondialdeído
Me	Metil
<i>m/e</i>	Razão massa/electrão (<i>mass to electron ratio</i>)
MFP	Produto fluorescente Maillard (<i>Maillard fluorescent product</i>)
MG	Metilglioxal
MG-H1, MG-H2 e MG-H3	Isómeros de hidroimidazolona derivados para o metilglioxal
MG _{min} -HSA	Albumina do soro humano modificada com uma quantidade mínima de metilglioxal
MODIC	Dímero de lisina-arginina derivado para o metilglioxal
MOLD	Dímero de lisina derivado para o metilglioxal
MOPS	Ácido 3-morfolinoetanosulfónico
MRM	Monitorização de reacções múltiplas (<i>multiple reaction monitoring</i>)

MS	Espectrometria de massa (<i>mass spectrometry</i>)
MS ⁿ	Espectrometria de massa <i>tandem</i> (<i>tandem mass spectrometry</i>)
MW	Massa molecular (<i>molecular weight</i>)
<i>m/z</i>	Razão massa/carga (<i>mass to charge ratio</i>)
NFC	Composto não fluorescente (<i>non-fluorescent compound</i>)
<i>n_j</i>	Número de electrões envolvidos na oxidação de uma molécula da espécie <i>j</i>
NLMDD	Derivado de dihidropiridina para a lisina
NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
<i>N_p</i>	Número de cargas elementares da gota precursora
NPMDD	Derivado de dihidropiridina para a propilamina
<i>p</i>	Eficiência de amostragem no espectrómetro de massa ESI
<i>P</i>	Pressão
PD	Desorção por plasma (<i>plasma desorption</i>)
pH	Potencial hidrogenoiónico
pKa	- Logaritmo decimal da constante de acidez
PTB	Brometo de fenacil tiazolo (<i>phenacyl thiazole bromide</i>)
PUFAs	Ácidos gordos poliinsaturados (<i>polyunsaturated fatty acids</i>)
<i>q</i>	Carga da gota
QIT	Ion trap quadrupolar (<i>quadrupole ion trap</i>)

$q_{z\text{-ejecc}}$	Valor de q_z no diagrama de estabilidade do ion trap quadrupolar que contempla uma situação de ejeção iónica.
$q_{z\text{-excit}}$	Valor de q_z no diagrama de estabilidade do ion trap quadrupolar que contempla uma situação de excitação ressonante de iões.
r	Coordenada na direcção radial (x, y)
R	Raio da gota carregada
r_0	Raio interior do eléctrodo anelar do ion trap quadrupolar
r_{ES}	Raio externo da agulha de electrospray
resíduo _{est i}	Resíduo da estrutura i
rf	Radio-frequência
R_g	Resposta instrumental do ião g
RIA	Ensaio radioimunológico (<i>radioimmunoassay</i>)
RNase	Ribonuclease
ROS	Espécies reactivas de oxigénio (<i>reactive oxygen species</i>)
r.t.	Temperatura ambiente (<i>room temperature</i>)
SCE	Eléctrodo saturado de calomelano (<i>saturated calomel electrode</i>)
SIM	Monitorização de ião seleccionado (<i>single ion monitoring</i>)
SIMS	Espectrometria de massa de iões secundários (<i>secondary ion mass spectrometry</i>)
t	Tempo
TDC	Corrente total das gotas
THF	Tetrahidropirimidina
TIC	Corrente iónica total (<i>total ion current</i>)
TPA ⁺	Ião tetrapentilamónio

U	Amplitude da corrente dc
V	Amplitude da voltagem rf
V_{ar}	Potencial do ar
V_{ES}	Vontagem aplicada na agulha de electrospray
V_{f}	Velocidade de fluxo da solução na fonte de electrospray
$V_{\text{p-p}}$	Volt _{peak to peak}
V_{res}	Voltagem apropriada para promover a ressonância de um ião
V_{solvente}	Potencial do solvente
z	Coordenada na direcção axial
z_0	Distância axial do centro do dispositivo ao ponto mais próximo de um dos eléctrodos <i>end cap</i> do ion trap quadrupolar
β_z e β_r	Valores característicos que definem as fronteiras do diagrama de estabilidade para o movimento dos iões no ion trap quadrupolar
Γ	Tensão superficial
I	Velocidade do fluxo da solução
ε_0	Permitividade do vácuo
v_j	Fluxo de solução na agulha de electrospray
λ_{m}^0	Conductividade molar limitante do electrólito
σ_S	Conductividade específica da solução
Ω	Frequência principal
$(j)_i$	Ião j no seio da gota
$(j)_s$	Ião j na superfície da gota
$[j]_i$	Concentração do ião j no seio da gota
$[j]_s$	Concentração do ião j na superfície da gota
$[Q]$	Concentração do excesso de carga Q na superfície da gota

1. Introdução geral.

Este capítulo tem como finalidade introduzir o assunto a que se respeita esta dissertação: aplicação da espectrometria de massa ao estudo da reacção de Maillard, na base das reacções dos aminoácidos arginina e lisina, e derivados do grupo arginil, como guanidina e aminoguanidina, com compostos de α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos. O objectivo da presente dissertação prende-se com o estudo das espécies moleculares mais reactivas envolvidas na reacção de Maillard, como é o caso dos aminoácidos arginina e lisina e dos compostos α -dicarbonilo, sendo estes últimos formados no decurso da referida reacção. O facto dos aminoácidos referidos serem os principais alvo da reacção de Maillard, uma vez que se traduzem por espécies extremamente reactivas, conjuntamente com os grupos *N*-terminais de aminoácidos, em moléculas mais complexas como proteínas, e o facto dos compostos α -dicarbonilo serem importantes intermediários formados ao nível da reacção de Maillard, também responsáveis por modificar os compostos amina mencionados, conduziu à elaboração de uma investigação sobre a relação estrutura/actividade das formas amina e de α -dicarbonilo. Nesta perspectiva, não só as formas derivadas dos compostos amina, em particular dos resíduos de arginina mais reactivos, como a guanidina e a aminoguanidina, foram investigadas em termos da sua reactividade, como também a reactividade de formas de α -dicarbonilo, compreendendo estas últimas tanto os simples compostos glioxal, metilglioxal e diacetil, como formas de maior cadeia alquílica (2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona), e formas que incluem grupos substituintes arílicos (fenilglioxal e 1-fenil-1,2-propanodiona).

No estudo da reactividade de vários compostos amina e dos α -dicarbonilos mencionados, recorreu-se ao uso de técnicas de espectrometria de massa, sobretudo as que envolvem a ionização por electrospray e espectrometria de massa *tandem* (MS^n). Como foi usada a espectrometria de massa de ionização por electrospray (ESI-MS) na análise das misturas reaccionais que incluem os compostos referidos, houve também a necessidade de investigar o comportamento de espécies de analito e de electrólito/surfactante, segundo as condições empregues em ESI-MS, isto relativamente ao comportamento das espécies em solução, e, como tal, de estudar o mecanismo envolvido em electrospray, o qual tem sido alvo de importantes estudos e de

esclarecimentos, de algum modo consistentes, no âmbito da espectrometria de massa [1–7].

1.1. Importância da reacção de Maillard.

A reacção de Maillard, que remonta ao início do século passado (1912), tivera na sua origem os trabalhos pioneiros do Químico Francês Louis-Camille Maillard [8], o qual, numa curta publicação submetida à academia Francesa, enunciara, o que parecia ser um fenómeno simples; o aquecimento suave de açúcares com aminoácidos em água, com o desenvolvimento de soluções amarelo-acastanhadas. Apenas no início dos anos cinquenta, do século XX, surgiu o primeiro estudo compreensivo, realizado por Hodge [9], sobre as reacções estudadas por Maillard, em que se apresenta um mecanismo para a interpretação dos processos químicos ocorridos, revelando que a reacção de Maillard é, na verdade, bastante complexa. Esta reacção não inclui apenas uma única reacção, mas sim um complexo sistemas de reacções. Desde a proposta do primeiro esquema coerente para a reacção de Maillard [9], tem surgido o interesse do estudo da reacção no âmbito da química alimentar, que se tem perpetuado até à actualidade. É verdade que o lapso de tempo ocorrido, entre os estudos pioneiros de Maillard e o reconhecimento da mesma no campo da química alimentar, é grande, o que se deve muito seguramente à ausência de técnicas e de métodos analíticos adequados para o estudo da referida reacção. Aliás, o refinamento, e o desenvolvimento, de técnicas analíticas, como as técnicas cromatográficas e de espectrometria de massa, tivera o seu início na segunda metade do século XX. No campo da química alimentar, verificou-se que a ocorrência da reacção de Maillard afecta francamente a qualidade dos alimentos. Neste sentido têm existido grandes esforços no estudo da reacção de Maillard ao nível da indústria alimentar, uma vez que reacção de Maillard está directamente relacionada com o desenvolvimento do aroma dos alimentos, com o seu sabor e aparência (cor) e, em particular, com determinados processos tradicionais, e.g. com a produção de pão, tostas, bolos, cereais, e com a confecção de carnes, entre outros. É de notar que a reacção de Maillard não é só importante ao nível da confecção dos alimentos, mas também ao nível do seu armazenamento. Ao nível da química alimentar, a reacção de Maillard tem um papel de relevo na importância nutricional dos alimentos, pois a ocorrência da reacção da Maillard pode ser responsável pela formação de compostos tóxicos e mutagénicos [10], o que pode estar eventualmente associado a um decréscimo da digestibilidade dos

alimentos, e consequente perda do seu valor nutricional e da sua qualidade. Além disso, tem existido alguma evidência para a implicação da reacção de Maillard na formação de compostos carcinogénicos, como a acrilamida [11,12]. Muito embora a existência destes efeitos menos benéficos, atribuídos à ocorrência da reacção de Maillard nos alimentos, tem-se verificado que esta reacção pode também conduzir à formação de compostos anti-oxidantes [13], o que é seguramente compensador em termos da qualidade alimentar. Com esta exposição, é possível referir que a complexa reacção de Maillard pode estar implicada com a formação de compostos nocivos que proporcionam uma perda da qualidade e da viabilidade dos alimentos, e também pode ser entendida na perspectiva de que a compreensão dos processos reactivos Maillard tem um papel de relevo na confecção e no armazenamento dos alimentos, no sentido da optimização da sua apresentação, qualidade e valor nutricional. Estes últimos aspectos inserem-se obviamente no contexto da indústria alimentar.

Desde o primeiro estudo compreensivo sobre a reacção de Maillard, realizado por Hodge [9], a referida reacção tem tido um impacto fortíssimo no campo da química alimentar. Todavia, o reconhecimento da importância da reacção de Maillard na fisiologia, sobretudo no que respeita à modificação de proteínas pelos açúcares fisiológicos *in vivo* e sua relação com desenvolvimento de determinadas patologias (e.g. diabetes *mellitus*) e com o envelhecimento, ocupa uma cronologia muito posterior ao da já estabelecida reacção no campo da química alimentar. Os primeiros estudos sistemáticos sobre a importância da reacção de Maillard *in vivo* datam do início da década de oitenta, do século XX [14–17]. Apesar deste facto, já anteriormente se tinha observado que o fenómeno de glicolização não-enzimática era responsável por determinadas modificações em proteínas fisiológicas [15], embora não houvesse constituição de prova de que a reacção de Maillard tivesse alguma relação com o desenvolvimento de determinadas patologias e com o envelhecimento, como hoje bem se conhece. O estabelecimento da reacção de Maillard *in vivo*, no que respeita ao desenvolvimento de determinadas patologias e do envelhecimento teve, na sua origem, a semelhança observada que as proteínas modificadas, em amostras de indivíduos diabéticos, apresentavam com o respectivo envelhecimento das proteínas em causa, o que levou a concluir que indivíduos diabéticos apresentavam uma anormal deterioração de determinadas proteínas, muito comparável com as proteínas de indivíduos envelhecidos [17]. Desde esta constatação, que se intensificara a investigação da reacção de Maillard *in vivo*, sobretudo ao nível do estudo da modificação de proteínas

com tempo de vida longo, como o colagénio, cristalino, e nervos. Com isto surgiu a necessidade de identificar as espécies moleculares e os respectivos processos reaccionais envolvidos. A reacção de Maillard tem actualmente o seu reconhecimento nos processos *in vivo*, sobretudo os relacionados com a modificação de grupos amina em proteínas, ácidos gordos, e até mesmo ácidos nucleicos, com açúcares redutores fisiológicos, como a glucose e a frutose, e com compostos derivados carbonílicos, como os compostos α -dicarbonilo, em particular glioxal, metilglioxal e deoxiglucosonas. Às reacções de grupos amina nas biomoléculas referidas com os açúcares redutores e seus derivados de menor massa molecular, tem-se atribuído a designação do fenómeno de glicação, que ocorre não enzimaticamente. No campo da glicação, tem existido um franco esclarecimento dos processos reactivos Maillard, com a identificação de inúmeros compostos e com a realização de propostas mecanísticas convincentes. Compostos estes que são formados quer ao nível das fases iniciais quer da fase final da reacção de Maillard, sendo os respeitantes a esta última fase da reacção comumente designados por produtos finais da glicação avançada (AGEs); incluindo varidíssimas formas estruturais e funções biológicas. É de referir que a formação dos aductos moleculares mencionados (AGEs) encontra-se relacionada com o desenvolvimento de determinadas complicações clínicas da diabetes *mellitus* (complicações macrovasculares e microvasculares) [18–20], com doenças degenerativas, como a doença de Alzheimer [21,22], e com o envelhecimento [14,18,23]. Ao nível da glicação, tem sido reconhecido que os resíduos de arginina e de lisina nas proteínas constituem os alvos preferenciais da glicação *in vitro* e *in vivo*, pelos açúcares redutores e seus derivados carbonílicos [24,25]. Os derivados carbonílicos, como o glioxal e metilglioxal, têm uma relação directa com a formação de determinadas estruturas AGEs, e com o desenvolvimento de patogénese e ainda com o envelhecimento. Para além disso, sendo os compostos dicarbonílicos referidos extremamente reactivos, estes têm sido associados a determinados mecanismos fisiológicos, como os *stresses* oxidativo e carbonílico, contribuindo para interpretação dos processos reactivos Maillard *in vivo* e, consequentemente, para a extensão da relevância da referida reacção no desenvolvimento de determinadas patogénese e do envelhecimento [26,27]. Com esta exposição sobre os processos de glicação, é possível constatar que os processos reactivos Maillard se encontram de algum modo bem compreendidos, apesar de existir alguma controvérsia na atribuição de determinadas estruturas de AGEs e de determinados vias reaccionais. No entanto, a extensão da reacção de Maillard *in vivo* é

muito menor que a verificada ao nível dos alimentos, sobretudo ao nível da confecção dos alimentos. Existe, por vezes, a noção de que a extensão da reacção de Maillard *in vivo* se mostra equivalente à extensão da reacção observada ao nível do armazenamento dos alimentos [28]. Na glicação, onde os processos reactivos de Maillard são bem mais fáceis de se estudar, que na química alimentar, tem sido destacada a importância da reactividade dos resíduos de arginina e de lisina, e também de formas carbonílicas bastante reactivas, produzidas no decurso da reacção, como os compostos α -dicarbonilo.

Com a implicação da reacção de Maillard na química alimentar e *in vivo*, é seguramente possível concluir que a reacção de Maillard constitui um assunto de extrema importância, a diversos níveis, sendo por isso, do maior interesse o desenvolvimento de estudos que visem a interpretação dos complexos processos reactivos envolvidos.

1.2. Porquê recorrer a técnicas de espectrometria de massa para o estudo da reacção de Maillard?

A espectrometria de massa sofreu importantes avanços, sobretudo na segunda metade do século XX, com a introdução de novas fontes de ionização, e com a concepção de analisadores de massa mais simples, como os analisadores do tipo quadrupolo, tempo de voo, e armadilha de iões (ion trap), isto em comparação com a instrumentação dos aparelhos de sector. Todavia, nas duas últimas décadas, em especial, o campo da espectrometria de massa sofreu avanços bastante consideráveis, com a inclusão de fontes electrospray [29–33] e MALDI [34]. Estes métodos de ionização oferecem, em particular, e face aos métodos anteriores, a possibilidade de se estudar, de uma forma mais eficiente, moléculas não voláteis e altamente polares, que representam uma grande diversidade de compostos, nos quais se incluem os compostos de interesse biológico e biomédico. No que respeita à espectrometria de massa de ionização por electrospray (ESI-MS), foram ainda realizados importantes avanços, ao nível da operação da fonte de ionização e também do analisador de massa mais adequado, entre os quais se incluem os analisadores do tipo ion trap quadrupolar. A utilização de uma fonte de ionização por electrospray num analisador do tipo ion trap é talvez dos “acoplamentos” instrumentais que mais sucesso têm tido no domínio da análise por espectrometria de compostos com interesse biológico e biomédico. Tendo em consideração a natureza particular dos processos envolvidos em ESI-MS, bastantes

esforços têm sido dispendidos na elucidação do mecanismo envolvido. Estes esforços que conduziram à interpretação de partes crucias do mecanismo de electrospray [1–7], resultando, por isso, também numa extensão da aplicabilidade e viabilidade de ESI-MS. De facto é de salientar que as espécies iónicas detectadas em ESI-MS preservam muito do seu comportamento em solução. Tem-se aliás verificado que muitas características espectrais dos iões detectados em ESI-MS, apresentam frequentemente uma relação com os parâmetros iniciais das soluções dos respectivos analitos. Além disso, de acordo com a literatura, tem-se igualmente verificado que a espectrometria de massa de ionização por electrospray *off-line* se revela como um método extremamente vantajoso para o estudo da mecanística de reacções em soluções, incluindo reacções químicas e bioquímicas, e também de reacções de catálise homogénea [35]. Na verdade, é bem possível estudar reacções em solução por aplicação de ESI-MS *off-line*, em particular para sistemas reaccionais que não envolvam matrizes com uma elevada ordem de complexidade.

Tendo em atenção o exposto, as reacções de compostos amina reactivos com α -dicarbonilos, podem ser favoravelmente estudadas por recurso a ESI-MS *off-line*, pois os compostos amina podem facilmente sofrer protonação, verificando-se este efeito mesmo ao nível das soluções ajustadas ao pH fisiológico. Nas reacções referidas as estruturas de produtos de reacção deverão também incluir grupos amina, o que favorece a sua protonação, até mesmo em solução, e a sua consequente detecção como espécies iónicas na fase gasosa, segundo as condições empregues em ESI-MS. Importa referir que as soluções das misturas reaccionais, analisadas por ESI-MS, apresentam uma quantidade significativa de um tampão não volátil (HEPES) [36], possuindo este um comportamento de electrólito e de surfactante [37,38]. Como se pode constatar na literatura [39], a adição de importantes quantidades de espécies de electrólito nas soluções de analito parece favorecer o aumento da resposta dos iões analitos, em ESI-MS, contrariamente ao que seria de esperar, ou seja, a supressão dos iões analito. Estas deduções foram formalizadas na base da aplicação do modelo de partição de equilíbrio, proposto por Enke [40], num estudo que visava a investigação do efeito da adição de sais em solução na resposta dos analitos recorrendo a ESI-MS. Estes resultados são bastante promissores para os sistemas reaccionais abordados no trabalho de que se ocupa a presente dissertação.

É de notar que as técnicas de ESI-MS e MALDI têm sido largamente usadas, e com bastante sucesso, no estudo das modificações ocorridas em aminoácidos, péptidos,

proteínas e em outras biomoléculas, isto no contexto da reacção de Maillard; quer ao nível da química alimentar quer ao nível da glicação. Sobretudo no que respeita ao estudo das modificações de proteínas e de outras entidades biológicas de elevada massa molecular, inúmeras têm sido as metodologias desenvolvidas, auxiliadas às técnicas ESI-MS e MALDI, compreendendo desde a análise de fragmentos moleculares, resultantes das digestões ácida e enzimática de proteínas, à análise de proteínas intactas, e de suas formas associadas.

1.3. Objectivo e estrutura da dissertação.

Dada a relevância da reacção de Maillard, quer ao nível da química alimentar quer *in vivo*, e ao facto de funções básicas dos aminoácidos lisina e arginina se constituírem como espécies extremamente reactivas no contexto da reacção de Maillard, conjuntamente com a crescente importância das formas α -dicarbonilo, como intermediários produzidos no decurso dos processos reactivos em questão, e da sua reacção com os aminoácidos referidos, o trabalho desenvolvido nesta dissertação prende-se com o estudo das reacções dos aminoácidos lisina e arginina, e de formas derivadas do grupo arginil, como a guanidina e aminoguanidina, com compostos α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos. O trabalho que se apresenta nesta dissertação tem como objectivo o estudo da relação estrutura/actividade de compostos amina reactivos com formas α -dicarbonilo, no intuito de melhor se compreender a relação dos aspectos estruturais com a reactividade das espécies moleculares referidas, demonstrando estas espécies ser talvez mesmo das mais reactivas nos processos reactivos Maillard. As reacções em causa têm uma interface com os processos reactivos envolvidos na glicação, uma vez que os compostos amina e alguns dos compostos α -dicarbonilo estudados são bem representativos destes processos, possuindo também um destaque particular no contexto actual da glicação. Aliás, o estudo destas reacções, de compostos amina com compostos α -dicarbonilo, têm como primeiro objectivo a interpretação da funcionalidade e da versatilidade dos compostos α -dicarbonilo. De facto, de acordo com os aspectos estruturais destas reacções, por exemplo, os compostos α -dicarbonilo podem existir quer na forma nativa (dicarbonilos dicetónicos) quer nas formas nativa e hidratada (dicarbonilo aldeídicos) em solução, o que implica que haja também uma variabilidade ao nível da formação dos produtos de reacção, com os compostos amina. De uma forma sumária os objectivos da presente dissertação incluem:

- ✓ identificação e caracterização de produtos de reacção formados, no decurso das reacções dos compostos amina com os compostos α -dicarbonilo, recorrendo a técnicas de espectrometria de massa.
- ✓ estabelecimento de propostas mecanísticas para os sistemas de reacções dos compostos amina com α -dicarbonilos, incluindo os aspectos da versatilidade, funcionalidade e da reactividade dos compostos amina com as formas α -dicarbonilo.
- ✓ transporte, sempre que possível, da informação obtida, do ponto vista das propostas mecanísticas estabelecidas, para os processos de glicação relacionados, i.e. os que envolvem a reactividade de resíduos lisina e arginina com formas α -dicarbonilo.
- ✓ contribuição para uma melhor compreensão do mecanismo envolvido em ESI-MS, uma vez que algumas espécies moleculares incluídas nos sistemas reaccionais referidos, e.g. alguns compostos amina estudados na presença do tampão sulfónico HEPES, que possui carácter de electrólito e de surfactante, parecem evidenciar um comportamento peculiar nas condições usadas em ESI-MS, e também de certo modo bastante apelativo, até mesmo para uma possível extensão da aplicabilidade analítica das espectrometria de massa de ionização por electrospray *off-line*.

Em relação à estrutura da presente dissertação, é de destacar a inclusão de dez capítulos de interesse, incluindo o presente capítulo. Os capítulos II e III respeitam à reacção de Maillard e à espectrometria de massa, respectivamente. O capítulo IV inclui a descrição dos materiais e métodos envolvidos na realização experimental. Os capítulos V – IX estão relacionados com os estudos desenvolvidos, sobre as reacções dos compostos amina com os compostos α -dicarbonilo. No capítulo X tem-se a discussão geral da informação relativa aos capítulos V – IX, em particular, e as conclusões estabelecidas.

De seguida, far-se-á uma descrição mais pormenorizada sobre a finalidade, importância e algum conteúdo dos capítulos anteriormente referidos.

O capítulo II, relativo à reacção de Maillard, aborda os aspectos da importância da reacção de Maillard nos contextos da química alimentar e *in vivo*. É de notar que este capítulo apresenta alguma extensão, sobretudo no que respeita à importância da reacção

de Maillard *in vivo*. Em primeiro lugar, os sistemas de reacções estudados são bem representativos do contexto actual da glicação, isto no que respeita ao estudo de reacções modelo, de compostos contendo baixa massa molecular, em particular dos aminoácidos modificados acetil-lisina e acetil-arginina. Em segundo lugar, optou-se por estabelecer uma descrição, de certo pormenorizada, dos compostos identificados nos processos de glicação e das respectivas vias reaccionais envolvidas, de modo a contemplar a evolução do contexto da glicação, desde os primeiros estudos e primeiros pressupostos realizados, aos conceitos de maior extensão da reacção de Maillard, como é caso dos *stresses* oxidativo e carbonílico, e até mesmo no que se refere ao próprio conceito de controlo e de inibição da glicação. A finalidade desta ampla descrição tem como objectivo de algum modo dar a conhecer que apesar da química dos processos de glicação se mostrar francamente bem compreendida, existem situações que geram ainda alguma controvérsia, muito provavelmente devido ao facto de em geral se estudar química reaccional no âmbito das condições fisiológicas, o que poderá ser possível de alguma crítica. O significado fisiológico de determinados produtos de reacção e de determinadas vias reaccionais estabelecidas deve forçosamente advir do conhecimento do mecanismo reaccional, devendo este compreender o estudo das reacções em condições reaccionais que não apenas as condições fisiológicas. Trata-se de química reaccional, simplesmente.

O capítulo III respeita, como referido, à espectrometria de massa, com particular ênfase para a espectrometria de massa de ionização por electrospray; técnica de espectrometria de massa utilizada na análise das misturas reaccionais estudadas neste trabalho. Este capítulo, à semelhança do anterior, tem alguma extensão. Esta extensão justifica-se pelo facto de no presente trabalho de investigação se ter abordado aspectos e metodologias relacionadas com a interpretação do mecanismo envolvido em ESI-MS, o que, por conseguinte, implica situar o assunto no contexto bem definido e bastante específico dos aspectos do mecanismo de electrospray. Por outro lado, para se estabelecer este tipo de aproximação à técnica ESI-MS, torna-se necessário utilizar também algum pormenor na descrição da operação e da instrumentação dos diversos componentes de interesse de um espectrómetro de massa.

No capítulo IV tem-se a descrição dos materiais e métodos utilizados na actividade experimental, que compõe o presente trabalho de investigação. Neste capítulo, e sobretudo no que respeita às técnicas de espectrometria de massa, propõe-se sempre que necessário uma interpretação de determinados critérios específicos da

operacionalidade do instrumento de massas utilizado, isto na base dos comportamento dos sistemas reacionais em causa.

Nos capítulos V – IX, incluem-se os estudos realizados sobre as reacções dos compostos amina (acetil-lisina, acetil-arginina, guanidina e aminoguanidina) com os α -dicarbonilos aldeídicos (glioxal, metilglioxal e fenilglioxal) e dicetónicos (diacetil, 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona). As reacções dos compostos guanidina e aminoguanidina com fenilglioxal, em particular, não puderam ser estudadas. É de notar que para as reacções da acetil-arginina, a informação fora reunida em dois estudos, dada a diversidade de informação obtida. Estes capítulos (V – IX) apresentam uma estrutura similar, incluindo inicialmente os objectivos do estudo realizado, seguido do manuscrito aceite ou submetido para publicação numa revista internacional da especialidade consoante o caso, e, por fim, apresentam-se as conclusões estabelecidas para o estudo em causa. Optou-se por esta forma de exposição dos estudos realizados, tendo-se observado, contudo, o cuidado necessário para uma disposição sequencial dos assuntos, e dos respectivos conteúdos.

Por fim, no capítulo X tem-se a discussão sobre a informação reunida nos capítulos anteriores (V – IX), pelo que se optou, por simplicidade, por discutir separadamente os aspectos relativos ao comportamento mecanístico dos sistemas reacionais estudados e os aspectos relativos à importância da informação mecanística obtida nos processos de glicação relacionados.

De realçar ainda que todos os artigos publicados e aceites para publicação ou submetidos foram escritos por mim, tendo sido enviados após as devidas correcções. A minha contribuição para estes artigos foi pois maioritária.

1.4. Bibliografia.

- [1] Kebarle P. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 804.
- [2] Cole RB. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 763.
- [3] van Berkel GJ. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 773.
- [4] Amad MH, Cech NB, Jackson GS, Enke CG. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 784.
- [5] de la Mora JF, van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 939.
- [6] Cech NB, Enke CG. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; **20**: 362.

- [7] Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *Anal. Chim. Acta.* 2000; **406**: 37.
- [8] Maillard L-C. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci. Ser.* 1912; **154**: 66.
- [9] Hodge JE. *J. Agric. Food Chem.* 1953; **1**: 928.
- [10] Nagao M, Takahashi Y, Yamanaka H, Sugimura T. *Mutat. Res.* 1979; **68**: 101.
- [11] Stadler RH, Blank I, Varga N, Robert F, Hau J, Guy PA, Robert M-C, Riediker S. *Nature.* 2002; **419**: 449.
- [12] Mottram DS, Wedzicha BL, Dodson AT. *Nature.* 2002; **419**: 448.
- [13] Griffith T, Johnson JA. *Cereal Chem.* 1957; **34**: 159.
- [15] Schnider SL, Kohn RR. *J. Clin. Invest.* 1981; **67**: 1630.
- [14] Monnier VM, Cerami A. *Science.* 1981; **211**: 491.
- [16] Brownlee M, Vlassara H, Cerami A. *Diabetes.* 1985; **34**: 938.
- [17] Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; **81**: 583.
- [18] Njoroge FG, Monnier VM, em *The Maillard reaction and aging, diabetes and nutrition.*, Baynes JW, Monnier VM (eds.), Alan R. Liss, Nova Iorque, 1989, pp. 85–109.
- [19] Brownlee M. *Nature.* 2001; **414**: 813.
- [20] Brownlee M. *Diabetes.* 2005; **54**: 1615.
- [21] Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; **91**: 4766.
- [22] Smith MA, Tanida S, Richey P, Miyata S, Yan SD, Stein D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; **91**: 5710.
- [23] Vlassara H, Bucala R, Striker L. *Lab. Invest.* 1994; **70**: 138.
- [24] Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
- [25] Ahmed N, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 15.
- [26] Rahbar S, Figarola JL. *Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents.* 2002; **2**: 135.
- [27] Monnier VM. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 1.
- [28] Trivelli LA, Ranney HM, Lai H-T. *N. Engl. J. Med.* 1971; **284**: 353.
- [29] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4451.
- [30] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4671.
- [31] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 675.
- [32] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1984; **277**: 379.

- [33] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov MV, Nikolaev VI, Shkurov VA. *Zh. Anal. Khim.* 1985; **40**: 1272.
- [34] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1193A.
- [35] Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **246**: 84. (e referências incluídas)
- [36] Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. *Biochemistry.* 1966; **5**: 467.
- [37] Vasconcelos MT, Azenha MA, Lage OL. *Anal. Biochem.* 1996; **241**: 248.
- [38] Vasconcelos MT, Azenha MA, Almeida CM. *Anal. Biochem.* 1998; **265**: 193.
- [39] Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 625.
- [40] Enke CG. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 4885.

2. Reacção de Maillard.

2.1. Introdução.

A importante necessidade de compreender o significado do mundo vivo tem levado a ciência e o seu método a uma exaustiva definição do mundo molecular organizado. Estruturas moleculares organizadas, que constituem o mundo vivo, têm sido alvo de uma intensa investigação, sobretudo no que se refere à compreensão dos seus aspectos estruturais e funcionais, os quais muitas vezes são traduzidos à luz de modelos adequados. A modificação de organizados moleculares, como as proteínas, tem fornecido uma informação valiosa sobre os meios dinâmicos que as utilizam, e sobre estes, a sua delimitação e ponto de estudo depende, em grande medida, da utilidade que as “moléculas organizadas” puderem proporcionar. Açúcares simples, como a glucose, constituem um importante recurso energético dos organismos superiores. Estes açúcares encontram-se ao nível dos congéneres alimentares e, por isso, também fazem parte do ciclo biológico dos organismos superiores. A modificação dos resíduos dos aminoácidos básicos, como a lisina e a arginina, bem como a modificação de funções α -amino de aminoácidos terminais, nas proteínas, pelos açúcares é bem conhecida. A importância no estudo destas modificações prende-se com os efeitos, muitas vezes nocivos, que estas traduzem, quer ao nível da química alimentar quer ao nível da fisiologia. As referidas modificações, dos resíduos dos aminoácidos pelos açúcares, têm na sua base interpretativa a reacção de Maillard, cuja descrição remonta ao início do século XX, com os trabalhos do químico Francês, Louis-Camille Maillard [1]. Este investigador, estudou pela primeira vez as reacções de aminoácidos simples com açúcares, verificando, contudo, que as reacções progrediam com o aumento da temperatura e com o decorrer do tempo [1]. A importante descoberta de Maillard, não é tanto ao nível do conteúdo, mas ao nível do impacto que o seu estudo iria causar em campos tão diversificados da ciência e da tecnologia, de que a química alimentar, a bioquímica, as ciências biológicas e a medicina, são exemplo. O primeiro esquema coerente foi proposto por Hodge [2] (Fig. 2.1), que, para uma fase inicial da reacção, enuncia que um açúcar redutor, como a glucose, se condensa com um composto portador de um grupo amina livre, resultando na formação de um produto de condensação, a glicosilamina *N*-substituída. Como referido anteriormente, a proveniência do grupo amina livre é atribuída a aminoácidos ou a resíduos de aminoácidos nas proteínas, sobretudo aos resíduos dos aminoácidos básicos lisina e arginina, e também a grupos α -

amina de aminoácidos terminais. A glicosilamina, por rearranjo, origina a formação da base de Schiff, e, posteriormente, do produto Amadori [2]. A subsequente degradação do produto Amadori foi considerada dependente do pH do sistema reaccional [2]. Para pH 7 ou inferior, o produto Amadori converte-se, por enolização-1,2, em furfural (quando pentoses estão envolvidas) ou hidroxifurfural (HMF) (quando hexoses estão envolvidas) [2]. Para pH > 7, a degradação do produto Amadori ocorre por enolização-2,3, dando lugar a espécies como a 4-hidroxi-5-metil-2,3-dihidroxifuran-3-ona, e de uma variedade de produtos de fissão, incluindo acetol, diacetil e piruvaldeído [2]. Estes produtos de menor massa molecular, que os açúcares de partida, são bastante reactivos e, por isso, responsáveis pelo desencadeamento de outras reacções [2]. Os grupos carbonilo podem condensar-se com grupos amina livres, resultando na incorporação de azoto nos produtos de reacção [2]. Compostos dicarbonilo irão, por sua vez, reagir com aminoácidos, com formação de aldeídos e de α -aminocetonas (Fig. 2.1) [2]. Este último processo reaccional é denominado degradação de Strecker [3]. Consequentemente, numa fase avançada da reacção, uma série de reacções sucedem-se, nomeadamente ciclizações, desidratações, reacções retroaldol, rearranjos, isomerizações e outras condensações que, por fim, conduzem à formação de polímeros azotados e de copolímeros, designados por melanoidinas (Fig. 2.1) [2]. É de referir que estes polímeros apresentam uma cor castanha e intensa, pelo que as reacções que conduzem à formação destas espécies poliméricas, são frequentemente denominadas reacções *browning*. Com a descrição do esquema proposto por Hodge [2], é fácil perceber a intrínseca complexidade da reacção de Maillard, a qual engloba uma variedade de produtos de reacção e de vias reaccionais. Posteriormente aos trabalhos de Hodge, importantes vias de reacção foram estabelecidas. McWeeny et al. [4] concluíram que os intermediários de relevo, na formação de cor, se traduzem pelos compostos 3-deoxiosuloses e 3,4-dideoxiosulos-3-enos, que, no caso da glucose, correspondem a 3-deoxihexosulose (DH) e 3,4-dideoxihexosulos-3-eno (DDH), respectivamente. Mais tarde, Ghiron et al. [5] constataram que os compostos 3-deoxi-2-hexosuloses, 1-deoxi-2,3-hexodiuloses e outros intermediários α -dicarbonílicos podem reagir com aminoácidos, que, por descarboxilação, conduzem à formação do denominado aldeído de Strecker (RHC=O). Em 1990, Huber e Ledl [6], identificaram e caracterizaram os compostos 1-deoxi- e 3-deoxiglucosonas, a partir da degradação térmica de produtos Amadori. Mais recentemente, e em concordância com os resultados já descritos, Tressl et al. [7], concluíram, através do uso de açúcares marcados (^{13}C -), que o mecanismo estabelecido

para a reacção de Maillard envolve diferentes vias reaccionais, nas quais os intermediários de relevo correspondem aos compostos 1-, 3- e 4-deoxihexosulose (Fig. 2.2). Para além do reconhecido efeito da progressão das reacções de aminoácidos com açúcares redutores, com o aumento da temperatura [2], é, igualmente sabido que o pH das misturas reaccionais tem uma influência importantíssima (Fig. 2.2). Yaylayan e Huyghues-Despointes [8], constataram que, em condições básicas, os produtos Amadori podem originar a formação de ácido acético e de piruvaldeído, bem como açúcares menores, na presença de aminoácido não reagido. Assim sendo, e dada a formação de compostos de baixa massa molecular, e de natureza volátil, a reacção de Maillard, para pH elevado, caracteriza-se pela produção de aroma. Conjuntamente com o facto do produto Amadori, e os seus derivados dicarbonílicos, poderem, por meio de reacções retroaldólicas, conduzir à formação de fragmentos de açúcares, mais reactivos que os açúcares de partida, de que são exemplo os derivados de hidroxiacetona, gliceraldeído e dicetonas, três mecanismos redox foram identificados, nos quais estão envolvidos os compostos α -hidróxi carbonilo, α -dicarbonilo e ácido fórmico. Também, mais recentemente, Berg e van Boekel [9] e van Boekel e Brands [10] reportaram que os ácidos fórmico e acético são dos principais produtos de degradação, na reacção de Maillard iniciada pelos açúcares lactose, e glucose e frutose, respectivamente. Na perspectiva de Tressl et al. [7], Yaylayan et al. [11] classificou a reacção de Maillard com a designação de “piscinas químicas”. Pois, para além das várias vias reaccionais que constituem a reacção de Maillard, são tidos em consideração os produtos reaccionais formados na base da reacção dos aminoácidos com os açúcares, dado que quer os aminoácidos quer os açúcares podem, independentemente, sofrer degradação. Nesta perspectiva, Berg [12] concluiu que a isomerização e as reacções de degradação dos açúcares podem, de forma quantitativa, ser mais importantes que a própria reacção de Maillard, como é no caso do aquecimento do leite. Finalmente, a importância central atribuída ao produto Amadori, também conhecido como o intermediário principal da reacção, tem sido questionada ao nível da química alimentar [13] e das ciências biológicas e biomédicas [14]. Embora sejam reconhecidas as tentativas de elucidação do mecanismo da reacção de Maillard, alguma controvérsia ainda persiste. No estudo de reacções complexas, como a reacção de Maillard, torna-se necessária uma criteriosa análise de quais as vias reaccionais a estudar, da identificação de reacções determinantes no processo reaccional global, e de uma cuidadosa gestão de toda a informação reunida, por recurso a modelos cinéticos adequados

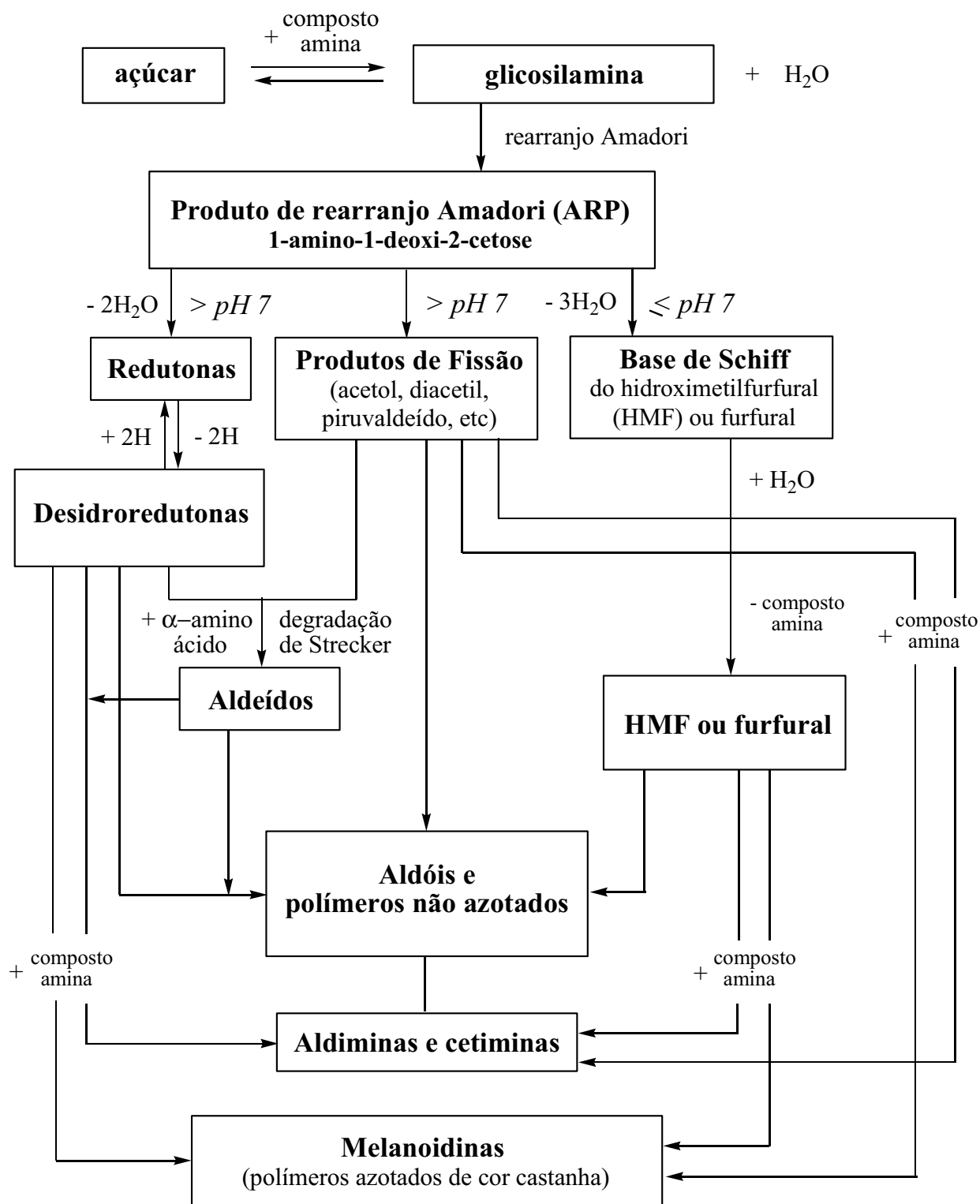


Figure 2.1. Esquema da reacção de Maillard (Ref. 2).

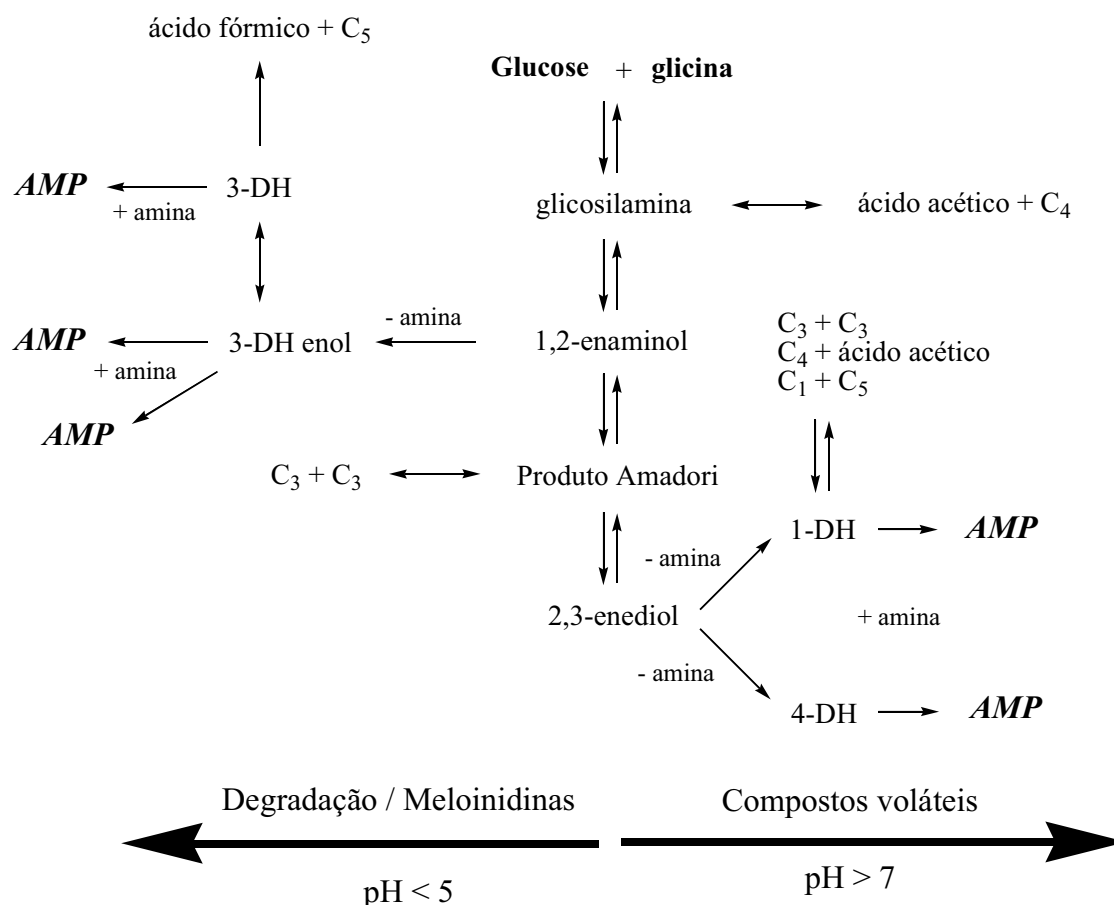


Figura 2.2. Esquema proposto para a reacção de Maillard glucose/glicina. C_i; fragmento de açúcar com *i* átomos de carbono. AMP (Produtos Avançados Maillard) (Ref. 7).

2.2. Reacção de Maillard na química alimentar.

A importância da reacção de Maillard foi primeiramente reconhecida no campo da química alimentar. Todavia, este reconhecimento tem a sua maior incidência após o início da segunda metade do século XX. Pensa-se que o lapso ocorrido, entre os trabalhos pioneiros de Maillard e o interesse da reacção no campo da química alimentar, em particular, se deva aos limitados recursos analíticos existentes até então. Com o desenvolvimento e refinamento de técnicas analíticas avançadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), e cromatografia gasosa (GC), e a introdução de técnicas analíticas de excelência, como a espectrometria de massa, o interesse da reacção de Maillard no campo da química alimentar foi progredindo sucessivamente. Na química alimentar, a reacção de Maillard tem um papel fundamental, podendo contribuir para o melhoramento da aparência e do sabor dos alimentos. Na indústria

alimentar, um dos grandes desafios consiste na manipulação do sabor, do aroma e da própria cor dos alimentos, de forma a que estes sejam mais apelativos ao consumo, sem que por isso haja perda do seu valor nutritivo e da sua qualidade. Alguns compostos produzidos no decurso da reacção são nocivos, devido à sua toxicidade e efeito mutagénico. Para além disso, estes compostos podem reduzir a digestibilidade e o valor nutritivo dos alimentos. Por outro lado, os efeitos mencionados podem ser atenuados ou melhorados pela formação de produtos da reacção de Maillard, de natureza antioxidante. Assim sendo, no *browning* dos alimentos, é lógico referir que a quantidade e qualidade destes depende dos precursores existentes, dos parâmetros do processamento térmico, do pH, e da razão quantitativa entre os grupos amina livres e o açúcar redutor. Lane e Nursten [15] realizaram um estudo elaborado, sobre os odores produzidos em sistemas de reacções de Maillard. Identificaram 12 aminoácidos, dos quais, cinco a sete aminoácidos se pensa estarem envolvidos na produção do pão, biscoitos crocantes, bolos ou no desenvolvimento de aroma. Estes resultados foram observados a cada uma das quatro temperaturas estudadas, para combinações aminoácido/glucose, a temperaturas diferentes. Numa data próxima da dos trabalhos de Lane e Nursten, Fors [16] publicou uma extensa recolha de informação sobre as propriedades sensitivas de produtos voláteis produzidos na reacção de Maillard e de compostos análogos. Posteriormente, Teranishi et al. [17] organizou uma revisão sobre os aspectos térmicos da produção de aroma nos processos reactivos Maillard.

A extensão da reacção de Maillard, ocorrida nos alimentos, é usualmente averiguada por recurso à análise dos polímeros e dos co-polímeros formados (melanoidinas), os quais apresentam uma cor acastanhada e intensa (Fig. 2.1). É, pois, na fase final da reacção de Maillard que estas espécies moleculares surgem, devido à condensação e polimerização de intermediários corados e de outros precursores reactivos (produtos enaminol, análogos de açúcar de baixa massa molecular, produtos dicarbonílicos insaturados) (Fig. 2.1). A formação de polímeros de cor castanha é favorecida pela presença de um catalisador amina (Fig. 2.1). Ainda considerando a formação dos polímeros de cor castanha, estes possuem uma elevada massa molecular, contendo, a nível estrutural, anéis furano e azoto, podendo, igualmente, conter grupos carbonilo, carboxilo, amina, amida, pirrolo, indolo, azometinas, éster, éter, e grupos metilo e hidroxilo [18–20]. A formação dos compostos melanoidinas encontra-se relativamente bem sumariada e revista [21–24]. Todavia, o isolamento e a identificação de produtos Maillard corados tem sido normalmente conseguida pelo recurso ao estudo de sistemas

reacções modelo, nos quais estes produtos apresentam uma baixa massa molecular (< 500 Da). Hashiba [25] concluiu que o *browning* é directamente proporcional à capacidade redutora do açúcar e à quantidade de glicina reagida, através da comparação de diferentes açúcares com um único aminoácido. Mais recentemente, Rizzi [24] constatou que muitos produtos corados, formados no decurso da reacção de Maillard, se traduzem por produtos de retroaldolizações/desidratações de açúcares, os quais podem estar ou não coordenados a proteínas, ou a qualquer outra fonte de azoto amina. Em consonância, Hofmann [26], numa série de publicações, identificou produtos de cor castanha-vermelha e produtos vermelhos resultantes da reacção da arginina com glicoxal e furan-2-carboxaldeído, pentoses e aminoácidos primários, e hexoses e aminoácidos primários e secundários. No entanto, estes compostos corados apresentam uma minimização do seu carácter hidrofílico, o que é indicador da ocorrência de diferenças significativas nas propriedades hidrofílicas das meloinidinas. Este resultado é coerente com o obtido por Tressl et al. [7], no que respeita à formação de espécies de cor castanha, em sistemas reactivos de Maillard, e à identificação de componentes com uma importante actividade de policondensação. Miura e Gomyo [27], e Gomyo et al. [28], observaram a formação de vários compostos corados, i.e. os pigmentos azuis (Blue-M1 e Blue-M2), amarelos (Yellow-M1 e Yellow-M2), e vermelho (Red-M1), para uma fase inicial do sistema reactivo D-xilose/glicina. Mais recentemente, Hayase et al. [29] isolaram os pigmentos amarelos referidos (Yellow-M1 e Yellow-M2), os quais revelaram características de cor semelhantes à da reacção do composto de pirrole-2-carboxialdeído com 2,4-dinitrofenilhidrazina. Estes últimos investigadores observaram a formação do pigmento azul (Blue-M1), quando da incubação dos pigmentos amarelos, e concluíram que possivelmente o pigmento azul seria formado por descarboxilação a partir de duas moléculas de pigmentos amarelos [29]. Consequentemente, os autores sugeriram que o pigmento azul (Blue-M2) pode ser formado na reacção de adição do pigmento amarelo ao pigmento azul (Blue-M1) [29]. Deste modo, é possível deduzir que numa fase avançada da reacção de Maillard, as meloinidinas podem ser formadas por reacções de polimerização similares, entre determinados centros cromóforos. Actualmente, apenas foram estudadas estruturas parciais das meloinidinas. A origem e as espécies envolvidas na sua formação permanecem ainda por definir. Porém, sabe-se que existe uma relação entre a degradação de açúcares e a formação das meloinidinas, e que as espécies reactivas, resultantes da degradação dos açúcares, podem, em grande medida, contribuir para a formação de espécies poliméricas. Todavia, as espécies

formadas no decurso da reacção de Maillard, relacionadas com as principais vias de reacção entre os grupos amina livres e os açúcares, como é o caso da formação do produto Amadori, podem ter um menor significado para a formação das meloinidinas.

Na química alimentar, uma das consequências negativas da reacção de Maillard nos alimentos prende-se com a perda do valor nutritivo das proteínas envolvidas, o que pode resultar numa perda da qualidade e possível diminuição da viabilidade dos alimentos. Segundo estudos realizados [22,23,30], esta perda atribui-se a uma diminuição da digestibilidade, destruição e/ou inactivação biológica de aminoácidos, incluindo os aminoácidos essenciais como a lisina e o triptofano, inibição de enzimas proteolíticas e glicolíticas e, ainda, interacção com metais. Para além da modificação de determinados resíduos de proteínas, produtos formados no decurso da reacção de Maillard, podem ainda induzir profundas alterações na estrutura das proteínas, como é o caso da formação de aductos em resíduos das proteínas distantemente localizados [31,32]. Este efeito denomina-se *cross-linking*. Pensa-se que a perda do valor nutritivo dos alimentos está associada à formação de compostos mutagénicos, de que são exemplo os compostos dicarbonílicos, metilglioxal, diacetil e glioxal, no qual o metilglioxal apresenta uma maior actividade mutagénica [33]. Em contrapartida, efeitos desmutagénicos têm sido igualmente observados [34,35]. Parece existir uma relação entre os mecanismos de determinados sistemas reaccionais Maillard e a mutagenicidade dos produtos de reacção formados. A título de exemplo, observou-se que cetoses revelam uma maior actividade mutagénica que aldoses [36]. Ainda considerando a actividade mutagénica, a formação e a eliminação de espécies mutagénicas, nos sistemas de reacção Maillard, trata-se de uma matéria que necessita de uma atenção especial. A relação dos efeitos mutagénicos com os efeitos carcinogénicos, eventualmente potenciados pelos sistemas Maillard, não se encontra descrita na literatura. Não menos importante de referir é a produção de componentes de natureza antioxidante, na reacção de Maillard. Griffith e Johnson [37], demonstraram que a adição de 5% de glucose, a biscoitos açucarados, originou uma marcada diminuição do *browning* dos biscoitos e, como resultado, uma maior estabilidade face a danos oxidativos. Com esta descoberta, os produtos de reacção de vários aminoácidos com açúcares têm sido estudados com especial atenção face às propriedades antioxidantes que estes mesmos produtos podem potenciar, pela variação subtil de determinadas condições dos sistemas reaccionais Maillard. Em geral, tem de se ter a noção de que tanto efeitos desejáveis como efeitos menos desejáveis existem quando, nos alimentos,

os sistemas reactivos Maillard têm o seu importante papel. Assim sendo, torna-se importante assegurar um equilíbrio favorável entre os efeitos desejáveis e não desejáveis da reacção de Maillard, por forma a minorar o decréscimo da qualidade do alimento. É, pois, sempre mais recomendável, se ao manipularmos um determinado congénere alimentar, conseguirmos minimizar as perdas nutricionais envolvidas, com um aumento no ganho do sabor e de certas propriedades que poderão ser benéficas ao consumo alimentar (e.g. actividade antioxidante). A importante necessidade da compreensão da reacção de Maillard e do seu mecanismo envolvido, não se prende apenas no sentido de reconhecer os efeitos indesejáveis que esta poderá causar no campo da química alimentar, mas tem também importância ao nível da optimização dos processos tradicionais de confecção e desenvolvimento de novas tecnologias, que visam uma futura manipulação dos alimentos com a mínima perda da sua qualidade.

Embora na química alimentar a reacção de grupos amina livres com açúcares seja encarada como um sistema reaccional que é estimulado, um importante aspecto devido, em parte, à aplicação de determinados processamentos térmicos, e de condições de meio extremas (e.g. pH), intrínsecas à confecção e à manipulação dos alimentos, é a reacção das espécies referidas que poderá ocorrer, embora numa menor magnitude, mesmo ao nível do armazenamento dos próprios congéneres alimentares. É sabido que a modificação de resíduos dos aminoácidos básicos, em particular os resíduos de arginina e de lisina, nas proteínas, por açúcares redutores, como a glucose, ocorre *in vivo*. Porém, a investigação deste fenómeno, que respeita à reacção de Maillard, deu-se numa cronologia posterior à da já estabelecida importância da reacção de Maillard no domínio da química alimentar.

2.3. A reacção de Maillard *in vivo*.

Como glicação entende-se a modificação de resíduos de aminoácidos, em particular dos aminoácidos básicos arginina e lisina (os mais reactivos), nas proteínas, pela acção de açúcares redutores fisiológicos, como é o caso da glucose, segundo as condições fisiológicas (pH ~ 7.4; temperatura de 37 °C). É de referir que a glicação refere-se a processos reactivos não-enzimáticos. Os substratos envolvidos, em particular de determinados derivados de açúcares redutores, podem ter uma proveniência enzimática, ou melhor, estão envolvidos ou são formados por processos enzimáticos, que podem estar ou não relacionados com os aspectos da sua reactividade e da sua viabilidade

fisiológica. Quando processos enzimáticos estão na base da reactividade dos substratos, o fenómeno denomina-se glicolização. No fenómeno de glicação, o mais abordado na literatura, também, os açúcares redutores e derivados envolvidos, são na sua maioria ingeridos ou absorvidos, constituindo uma importante fonte de carbohidrato, sobretudo para os organismos superiores. Assim, depreende-se a importância da reacção de Maillard no estudo das reacções de glicação. A primeira proteína estudada que conduziu à detecção da ocorrência de glicação foi a Hemoglobina (Hb). Neste estudo, Trivelli et al. (1971) [38] constataram que a fase inicial da reacção de Maillard ocorre *in vivo*. Os primeiros estudos sobre a glicação datam da mesma década do estudo referido anteriormente. No final da década de setenta e início da década de oitenta, começou a existir alguma evidência para a relação entre as complicações da diabetes *mellitus* e as alterações em determinadas proteínas de longa vida, como o colagénio da pele humana.

A diabetes *mellitus* é de uma doença reconhecida desde a antiguidade [39]. O termo “diabetes *mellitus*”, primeiramente introduzido no século XVIII, teve na sua finalidade a distinção da urina diabética que, no palato, apresentava um sabor adocicado, em comparação com outros estados poliúricos em que urina não apresentava qualquer sabor ao nível do palato [39]. No contexto da glicação, o tipo de diabetes mais amplamente estudado corresponde à diabetes *mellitus* do tipo II. Indivíduos com este tipo de diabetes possuem resistência à insulina, em combinação com uma relativa deficiência na secreção de insulina. A sua origem não é conhecida, e indivíduos com diabetes *mellitus* podem permanecer vários anos sem qualquer tipo de diagnóstico, uma vez que as concentrações elevadas de glucose não são suficientes para a indicação dos sintomas clássicos da diabetes não controlada. Tendo em consideração que a existência de hiperglicémia e o seu diagnóstico ocupa, em geral, um período de tempo longo (9 – 12 anos), os pacientes correm o risco de desenvolver complicações microvasculares e neuropáticas durante este período [39]. As complicações a longo prazo da diabetes *mellitus* são semelhantes para ambos os tipos de diabetes, i.e. do tipo I e II, e são responsáveis pelo acréscimo da morbilidade e mortalidade dos indivíduos afectados [39]. As complicações a longo prazo da diabetes *mellitus* distinguem-se em complicações macrovasculares e microvasculares [39]. Complicações macrovasculares incluem doença coronária, aterosclerose, e doença vascular periférica [39]. Complicações microvasculares incluem retinopatia, nefropatia, e neuropatia [39]. A neuropatia diabética é a mais comum das complicações desta doença e as suas manifestações podem ser divididas em duas categorias: somática e visceral [39]. Para

além disso, a doença dos grandes e pequenos vasos sanguíneos pode resultar em enfarte do miocárdio, trombose, e em gangrena das extremidades inferiores [39].

Alterações ao nível do colagénio na diabetes, como a perda de solubilidade da proteína [40,41], resistência à digestão enzimática [42], a observação de resíduos de péptidos de elevada massa molecular quando da digestão enzimática [41], e o aumento da glicolização não-enzimática [41–43], aparentavam, de facto, uma semelhança com as modificações da referida proteína no processo de envelhecimento. A ocorrência de alterações fisiológicas precoces, em indivíduos diabéticos, sugeria a situação de uma aparente aceleração do processo de envelhecimento nestes indivíduos. Assim sendo, a relação das complicações de determinados processos de doença, como acontece na diabetes *mellitus*, e o envelhecimento, ao nível da modificação de determinadas proteínas, conduziu ao crescimento do interesse no seu estudo. O facto destas modificações, em proteínas, reflectirem um acentuar do fenómeno de glicolização não-enzimática [41–43], o qual associado à detecção de péptidos de elevada massa molecular [41], quando da digestão enzimática, levou ao estabelecimento do envolvimento da reacção de Maillard como base interpretativa para os processos reactivos ocorridos nas proteínas, ao nível da diabetes e do envelhecimento [44]. Aliás, nos primeiros estudos, que realçam a relevância do *browning* não-enzimático na diabetes, fora atribuída uma especial atenção para a fase inicial da reacção de Maillard, semelhante à que se verifica no armazenamento dos congéneres alimentares [38]. Em 1984, Monnier et al. [45] forneceram meios de prova de que as modificações do colagénio ao nível do envelhecimento de determinados tecidos e ao nível da diabetes apresentavam uma relação, no que respeita aos processos de glicolização não-enzimática ocorridos e à insolubilidade da proteína. Através de medições de absorvância (a 350 nm) e de fluorescência (excitação a 370 nm / emissão a 440 nm) em amostras de colagénio digerido enzimaticamente, os investigadores concluíram que o colagénio envelhecido, bem como o proveniente de indivíduos diabéticos, era semelhante ao das amostras de colagénio incubado com glucose *in vitro* [45]. Deste modo, Monnier et al. [45] concluíram que a hipótese do *browning* não-enzimático se traduzia por uma hipótese atractiva para a interpretação da irreversibilidade das lesões diabéticas, inferidas pela extensão do *cross-linking* das proteínas e pela diminuição da digestibilidade do colagénio modificado. É de notar que numa cronologia anterior ao estabelecimento da relação do *browning* não-enzimático com as complicações da diabetes *mellitus*, existia evidência para a ocorrência de modificações ao nível de

determinadas proteínas, em termos do envelhecimento [40,41,46–49]. Com a noção de que a modificação de proteínas de longa vida estaria, de facto, relacionada com a evolução de determinadas patologias e com o envelhecimento, o estudo deste tipo de proteínas intensificou-se, com particular ênfase para as proteínas do cristalino e dos nervos [50]. Com a implicação do *browning* não-enzimático nas complicações da diabetes, surgiu, também, uma crescente necessidade para a identificação dos aductos formados, ao nível da modificação das proteínas. É de notar que na cronologia dos primeiros estudos, sobre a possível implicação da reacção de Maillard *in vivo*, o termo glicolização não-enzimática era frequentemente usado, na medida em que não existia ainda o estabelecimento da importância da reacção de Maillard na fisiologia, de uma forma tão ampla e diversificada como hoje se conhece. Assim sendo, num contexto actual da reacção de Maillard *in vivo*, o termo glicolização não-enzimática deixou de ser considerado adequado, passando o termo glicação, a ser enunciado numa perspectiva não-enzimática.

Na década de oitenta e noventa do século passado houve, de facto, uma crescente intensificação no interesse do estudo da glicação. Actualmente, a glicação é ainda alvo de uma intensa investigação, em que tem sido conseguido um importante esclarecimento sobre os processos reactivos envolvidos, bem como sobre as espécies formadas.

Para além da modificação dos resíduos de aminoácidos básicos, nas proteínas, pelos açúcares redutores e derivados dicarbonílicos, a modificação de lípidos e de bases de nucleótidos tem sido igualmente observada.

2.3.1. Química e vias reaccionais envolvidas na formação de produtos finais da glicação avançada (AGEs).

A detecção da glicação *in vivo* é notoriamente observada na modificação de proteínas de longa vida, como é o caso do colagénio, cristalino e de proteínas dos nervos [50]. A extensão da modificação neste tipo de proteínas tem, certamente, fornecido uma indicação realista da importância da glicação no desenvolvimento de determinadas complicações clínicas e crónicas de doenças, e também sobre o envelhecimento. Como referido anteriormente, também a reacção de Maillard tem, neste contexto, um papel crucial, para a interpretação dos processos de glicação. Na base da química alimentar, alguns efeitos não desejáveis da reacção de Maillard *in vivo* podem ser igualmente destacados, como é o caso da diminuição da digestibilidade de

congêneres alimentares, insolubilidade, e aumento de resistência à desnaturação [51]. Estes efeitos traduzem certamente modificações acentuadas ao nível dos constituintes alimentares, e como tal das proteínas envolvidas. Ora, a modificação de proteínas de longa vida, como é o caso do colagénio e do cristalino, no contexto da glicação, traduz-se por uma profunda alteração da estrutura e da função das mesmas, conduzindo, assim, a anormalidades nos processos fisiológicos relacionados. Deste modo, foram realizados esforços para a identificação de inúmeros compostos produzidos no decurso da reacção de Maillard. Esses compostos são essencialmente formados numa fase final da reacção de Maillard, e frequentemente denominados produtos finais da glicação avançada (AGEs, advanced glycation end products). Numa versão simplificada, a reacção de Maillard pode ser discriminada em três fases significativas (Figura 2.3) [52]. Numa fase inicial, a reacção é iniciada pela formação reversível de uma base de Schiff entre um açúcar redutor e os grupos amina livres das proteínas (Figura 2.3). A base de Schiff, instável, origina, por rearranjos espontâneos, a formação de um composto cetoamina, mais estável que a base de Schiff, denominado produto Amadori – rearranjo de Amadori (rearranjo de Heyns para cetoses) (Figura 2.3). Numa fase intermédia da reacção, o produto Amadori, estável, sofre, num período de vários meses, uma série de reacções, que conduzem à formação de moléculas de baixa massa molecular, contendo grupos carbonilo, mais reactivas quando comparadas com as moléculas de açúcar iniciais (Figura 2.3). Numa fase final, quimicamente irreversível, como a fase antecedente, são formados aductos moleculares (AGEs) (Figura 2.3). AGEs são compostos de natureza muito diversificada, e podem ser distinguidos com base nas suas funções biológicas e fisiológicas [53–55]. Deste modo, alguns AGEs traduzem-se por *cross-links* não-sulfidrílicos, como a pentosidina e os derivados de imidazólio, conferindo, em regra, uma estabilidade anormal às proteínas glicadas face a acção de forças mecânicas e à degradação proteolítica. Alguns AGEs são reconhecidos como factores para receptores específicos na superfície das células (N_ϵ -carboximetil-lisina, hidroimidazolonas derivadas para o glioxal e metilglioxal). Outros AGEs constituem-se como marcadores e provisoros de risco para os processos de doença que os relacionam. Dada a natureza e a funcionalidade das formas AGEs enunciadas, é fácil compreender as modificações que os AGEs inferem ao nível da estrutura e funcionalidade das proteínas, portadoras de grupos amina livres. As modificações nos resíduos lisil, arginil ou *N*-terminal, das proteínas, pelos açúcares e derivados, resultam no desenvolvimento de estruturas mais polares e ionizadas, face aos próprios resíduos mencionados, as quais são responsáveis

pela ocorrência de alterações significativas ao nível da hidrofobicidade local das proteínas modificadas [56]. Apesar dos AGEs serem formados numa fase final da reacção de Maillard, a extensão dos processos de glicação não é comparável à extensão prevista do mesmo tipo de reacção no campo da química alimentar. A formação de polímeros e de co-polímeros (meloinidinas), ao nível da química alimentar, ou seja de entidades moleculares extremamente associadas, não tem sido observada na glicação. Esta situação deve-se, em parte, as condições extremas (e.g. de temperatura e de meio) que por vezes são aplicadas na confecção dos alimentos.

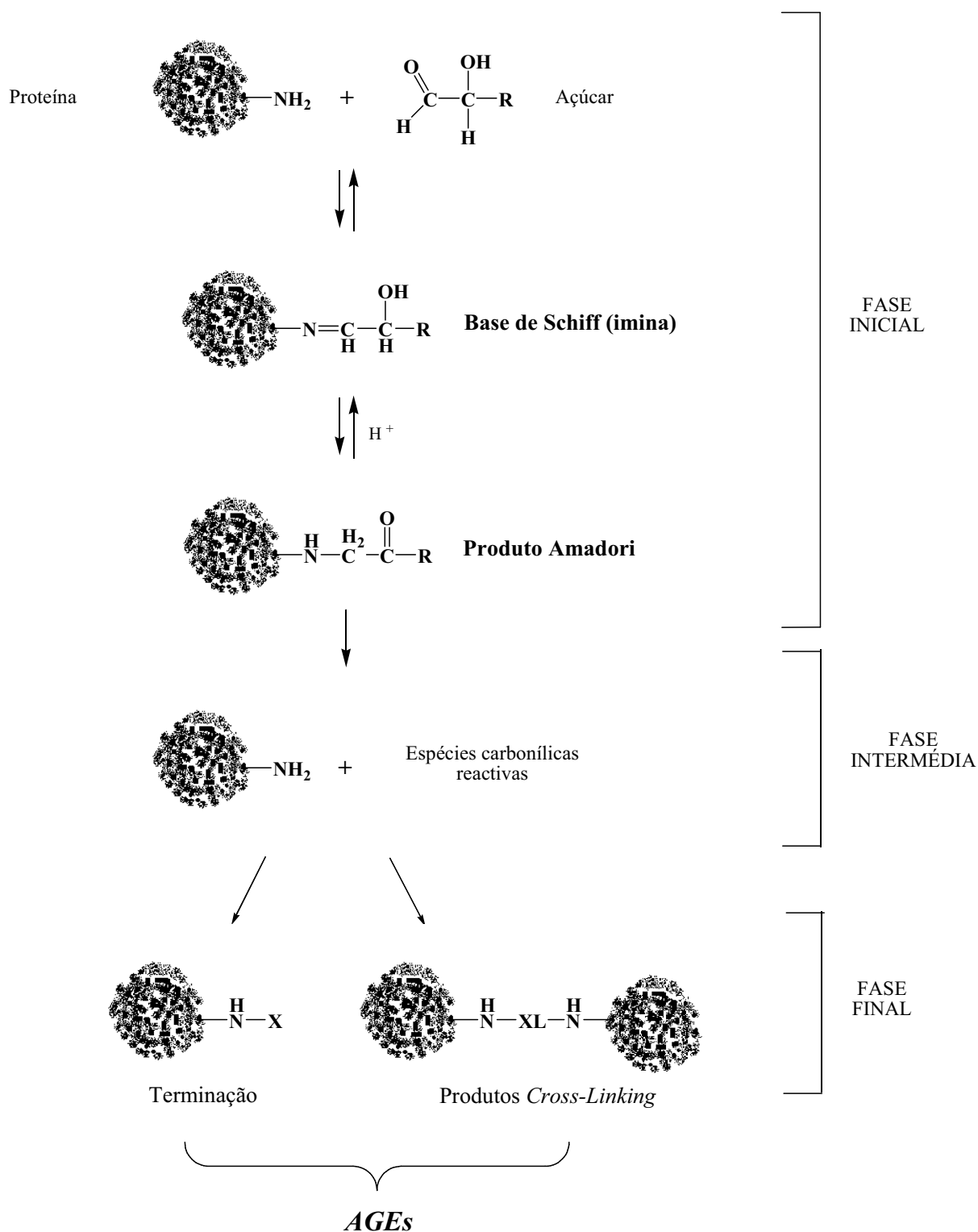


Figura 2.3. Mecanismo para a reacção de Maillard *in vivo* (Ref. 52).

Desde o estabelecimento da reacção de Maillard *in vivo* que existe evidência de que a glicação de proteínas pode ser descrita por um mecanismo reaccional, com o

importante envolvimento do produto Amadori. Todavia, diversos estudos têm sugerido, de forma convincente, que na glicação de proteínas outros mecanismos de reacção estão envolvidos, e que estes não incluem necessariamente processos de degradação do produto Amadori. Neste contexto, segundo a via reaccional de Namiki (Fig. 2.4), bases de Schiff, formadas no decurso dos sistemas reactivos Maillard, têm sido reconhecidas como precursores para a produção de compostos α -dicarbonilo e de espécies reactivas de oxigénio (ROS) [57]. Outros mecanismos alternativos para a modificação de proteínas, ao nível da glicação, estão igualmente representados na Fig. 2.4, incluindo autoxidação da glucose, via reaccional poliólica, fragmentação de trioses fosfato e catabolismo de cetonas – produção de metilglioxal, e produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA) e 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) [58–62]. Ainda relativamente à Fig. 2.4, é possível constatar-se que um importante passo nas reacções de glicação se traduz pela produção de intermediários reactivos, sendo a formação destes observada em todas as fases e vias reaccionais da glicação. Estes compostos são conhecidos como α -dicarbonilos (α -oxoaldeídos), e incluem espécies reactivas como 3-deoxiglucosona, glioxal e metilglioxal. 3-Deoxiglucosona é formada por rearranjos não-oxidativos e por hidrólise do produto Amadori, e ainda por frutose-3-fosfato, um intermediário da via reaccional poliólica. Por sua vez, metilglioxal é formado por reacções oxidativas e não-oxidativas [63], ao nível de várias vias reaccionais indicadas na Fig. 2.4. É de notar que metilglioxal é produzido pela maioria das células que metabolizam a glucose, sendo o enzima síntase responsável por catalizar a formação de metilglioxal. É de referir que a via não-enzimática mais relevante para a produção de metilglioxal se traduz pela peroxidação lipídica [64,65]. No que respeita ao dicarbonilo glioxal, este é formado por diversas reacções, como a fragmentação oxidativa de bases de Schiff (via reaccional Namiki) [66], peroxidação lipídica (via reaccional do acetol) [58], fragmentação da frutose-fosfato [67,68] e a autoxidação da glucose e do glicolaldeído [69–71]. O glioxal traduz-se também como o produto maioritário da oxidação do DNA, através do envolvimento de ROS [72]. O dicarbonilo 3-deoxiglucosona inactiva o enzima glutathiona peroxidase, i.e. um enzima responsável pela detoxificação do peróxido de hidrogénio, o que, por conseguinte, conduz a um aumento do *stress* oxidativo celular. Este dicarbonilo inactiva também o enzima glutathiona redutase, um enzima antioxidativo. Todavia, uma maior inactivação deste último enzima é proporcionado pelo HNE [62]. HNE parece contribuir para o desenvolvimento de determinados patogénese, como a doença de Alzheimer. A

acumulação de formas dicarbonilo, como o metilglioxal, ao nível da glicoxidação e lipoxidação tem sido responsável pelo *stress* carbonílico ao nível celular [73,74]. Este fenómeno revela-se importante ao nível da diabetes e uremia.

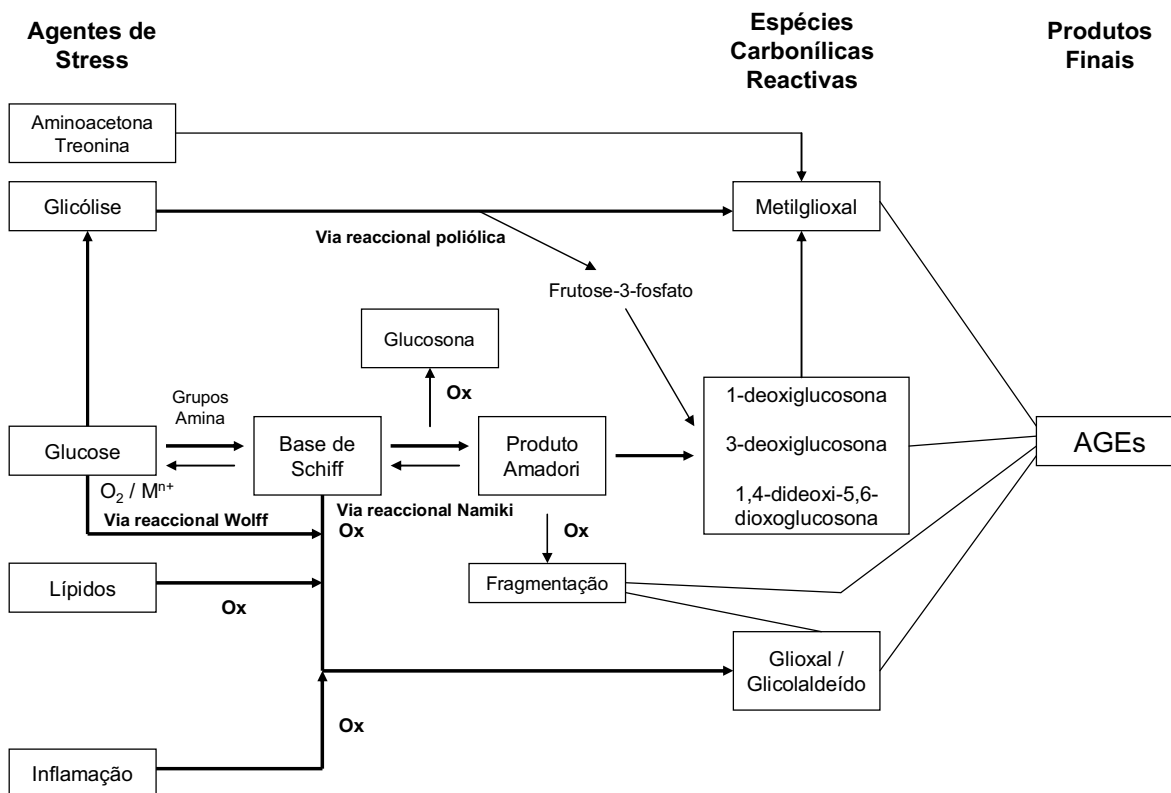


Figura 2.4. Vias reaccionais envolvidas na formação de AGEs *in vivo*.

2.3.1.1. Produto Amadori.

Estudos *in vitro* têm revelado que a formação do produto Amadori depende de vários factores, como a concentração de fosfato, pH e *stress* oxidativo. Estes factores podem ser também determinantes para a formação do produto Amadori *in vivo*. Produtos Amadori podem sofrer decomposição segundo três vias reaccionais distintas, e segundo condições oxidativas e não-oxidativas: por sucessivos rearranjos com formação de glucose, reacção inversa com formação de glucose e de manose, e processo inverso da via reaccional aldólica com formação de pentoses e de tetoses (Fig. 2.4) [58]. É de referir que apesar da importância inicialmente atribuída ao envolvimento do produto Amadori na glicação, estudos recentes têm consistentemente reforçado a importância da formação deste produto na reacção de formação de estruturas AGEs, incluindo as

unidades do tipo *cross-linking* [75–77]. Inclusive, nesta situação não tem sido observado, ao nível de mecanismos reaccionais propostos, a fragmentação da cadeia de açúcar do produto Amadori, como elo importante para a formação de AGEs [75–77].

2.3.1.2. Autoxidação da glucose.

Wolff et al. [68], em 1989, enunciaram que açúcares, como a glucose, são capazes de sofrer autoxidação, na presença de oxigénio molecular e de metais de transição, com produção de peróxido de hidrogénio, espécies reactivas α -dicarbonilo, nomeadamente glioxal, e radicais livres. Este processo reaccional, catalizado por metais de transição, parece contribuir para a modificação de proteínas pela glucose *in vitro* (Fig. 2.4). Por uso de um agente quelante para metais, e.g. DETAPAC, observou-se a inibição da autoxidação da glucose, e a redução da condensação da glucose a proteínas, bem como o desenvolvimento de produtos corados e fluorescentes. Deste modo, é possível inferir que o sistema de defesa antioxidativo e a quelatação de metais de transição podem eficientemente suprimir a autoxidação da glucose e a fragmentação oxidativa de bases de Schiff, o que retoma à importância do produto Amadori como precursor para a formação de AGEs. Numa série de estudos recentes [78–82], tem-se verificado que a autoxidação da glucose e a oxidação de resíduos glicosados, catalizados por metais de transição, se constituem como processos importantes para a produção de radicais livres, os quais podem favoravelmente representar-se como os contribuintes primários para os danos ocorridos em tecidos. A exposição de proteínas a níveis elevados de glucose *in vitro*, origina a fragmentação oxidativa das proteínas e modificações ao nível de resíduos de aminoácidos, com a acumulação de sulfóxido de metionina, *o*-tirosina, *m*-tirosina, ditirosina e 3-nitrotirosina. Várias modificações oxidativas associadas à glucose têm sido atribuídas a processos químicos Fenton, conduzidos por metais de transição, como o cobre e o ferro, os quais estão normalmente presentes nos tampões usados.

2.3.1.3. Via reaccional poliólica.

A via reaccional poliólica clássica, pela qual a glucose conduz à formação de sorbitol e de frutose, pode ser considerada como fonte para a formação de AGEs (Fig. 2.4). Como resultado da hiperglicémia na diabetes, a importância da via reaccional poliólica tem sido uma evidência, no que respeita à interpretação dos processos reaccionais envolvidência. Tem sido observado que metabolitos da via poliólica

aumentam as suas quantidades ao nível das proteínas do cristalino e de proteínas do plasma em indivíduos diabéticos [83–85]. Todavia, o inibidor aldose redutase pode minimizar a formação de metabolitos da via poliólica.

2.3.1.4. Produtos finais da glicação avançada (AGEs).

Apesar da reacção de Maillard compreender três fases significativas, inicial, intermédia e final, tem existido alguma dificuldade para o estabelecimento da distinção entre as duas últimas fases da reacção, intermédia e final [86]. Esta situação deve-se sobretudo à complexidade das referidas fases da reacção de Maillard e à sua inter-relação (Fig. 2.3).

É de notar que um número importante de estruturas AGEs tem sido identificado e caracterizado, nas reacções de glicação *in vitro*. A existência da quase totalidade das estruturas AGEs identificadas nos sistemas *in vitro* tem sido confirmada *in vivo*. Os sistemas reactivos *in vitro*, na base de reacções modelo, têm-se revelados adequados para estudar os processos de glicação, e sobretudo para a elucidação dos aspectos mecanísticos envolvidos na formação das estruturas AGEs. Torna-se importante ainda referir que tem existido um particular ênfase no que respeita às estruturas AGEs do tipo *cross-linking* para a elucidação da mecanística envolvida na formação de AGEs. Ao longo da última década, algumas estruturas AGEs, como os AGEs CML [87] e pentosidina [88], o último uma estrutura *cross-link*, ganharam um destaque particular no contexto da glicação. Mais, enquanto que algumas formas AGEs parecem derivar da reacção de açúcares ou de derivados de açúcares, outras têm na sua formação apenas o envolvimento de formas α -dicarbonilo, como por exemplo os dímeros de lisina GOLD [89] e MOLD [90], dihidroxiimidazolidinas e hidroimidazolonas [91–94], e tetrahidropirimidina [95]. Algumas estruturas AGEs são coradas, outras são fluorescentes, ao passo que outras não apresentam variação das suas propriedades espectroscópicas. Relativamente à estabilidade das estruturas AGEs, verifica-se que alguns AGEs se mostram resistentes a condições marcadamente ácidas, como as usadas na hidrólise ácida de amostras, embora outros AGEs se revelem lábeis nas mesmas condições. Na literatura, tem existido alguma controvérsia e resultados contraditórios sobre a identificação de determinados AGEs [95–97], e.g. FFI e 5-metilimidazolona, têm sido reportados, verificando-se, contudo, que algumas estruturas são artefactos (e.g. FFI) [96,97], produzidos ao nível do tratamento de amostras, ao passo que outras formas AGEs parecem ter sido erroneamente atribuídas (e.g. 5-metilimidazolona) [95].

Tem existido também controvérsia ao nível da reacção de formação de algumas estruturas AGEs, e.g. CML e pentosidina [57,75–77,86–88,93,98–102]. Todavia, mesmo o próprio conceito de glicação tem sido revisto, e a este propósito outros mecanismos têm sido igualmente contemplados, como o *stress* oxidativo e carbonílico, revelando-se úteis para a interpretação dos processos reactivos envolvidos, ampliando, por conseguinte, a visibilidade da reacção de Maillard na interpretação de determinadas patogenéses como a diabetes [103,104].

Tendo em consideração a diversidade de estruturas AGEs existentes na literatura, bem como a informação relativa aos aspectos da sua mecanística reaccional e da sua significância fisiológica, optou-se, neste capítulo, por discriminar a formação de **AGEs via açúcares redutores e via trioses, α -dicarbonilos e outros derivados carbonílicos de baixa massa molecular**, apesar de em determinadas estruturas AGEs, se tornar difícil a atribuição do envolvimento de formas α -dicarbonilo ou açúcar na sua formação, uma vez que formas α -dicarbonilo são frequentemente produzidas no decurso da reacção de grupos amina com açúcares redutores.

2.3.1.5. Formação de AGEs via açúcares redutores.

2.3.1.5.1. O artefacto FFI.

Num tempo não muito distante (década de oitenta), a evidência para a ocorrência de processos de glicação avançada *in vivo* baseava-se, primariamente, em critérios não específicos, como a detecção de fluorescência a 440 nm (excitação a 370 nm), e a presença de cromóforos de cor amarela (absorção a 350 nm) [44,105–110]. Torna-se claro que as primeiras constatações para a ocorrência de glicação *in vivo* tiveram a sua origem na utilização de técnicas espectroscópicas. Assim, com o contínuo interesse na compreensão destas variações espectroscópicas, que se mostravam como bons indicadores para a ocorrência da reacção de Maillard *in vivo*, surgiu a necessidade da identificação de importantes vias reaccionais e da identificação de espécies moleculares envolvidas na referida reacção. Apesar de existirem propostas estruturais para um importante número de produtos formados, ao nível da química alimentar, nenhuma destas estruturas tinham sido obtidas segundo às condições fisiológicas. Deste modo, as tentativas para detecção destas espécies moleculares *in vivo* seriam, certamente, dificultadas. Pongor et al. [111], em 1984, identificaram e a caracterizaram o que poderia ser o primeiro AGE, o composto de 2-(2-furoil)-4(5)-(2-furanil)-1*H*-imidazolo (FFI). FFI era uma molécula fluorescente, que fora inicialmente descoberta num

extracto de clorofórmio de uma solução amoníacal da hidrólise ácida de proteínas glicadas. FFI consistia num composto *cross-link* de proteínas. Em 1988, Horiuchi et al. [96] constataram que, no decurso da hidrólise ácida da solução de proteínas glicadas, é produzido um precursor não fluorescente do composto FFI, e que a formação do composto de FFI ocorre quando da adição de amónia à solução anterior. Deste modo, os investigadores forneceram evidência de que FFI não é um AGE [96]. O composto de FFI trata-se, ao que se parece, de um artefacto. Em 1988, Njoroge et al. [97] estudaram detalhadamente a formação do composto FFI e propuseram um mecanismo para a reacção envolvida (Fig. 2.5). Deste modo, a hidrólise ácida do composto cetoamina, formado na condensação do resíduo de lisina da proteína com açúcar, origina a formação do anél de imidazolo, ao nível do agregado de açúcar coordenado, o qual, por adição de amónia (fonte de amina), conduz à formação do composto dicarbonílico furoílglioxal (Fig. 2.5) [97]. A reacção deste último composto com NH_3 origina a formação do composto FFI (Fig. 2.5) [97]. Assim sendo, FFI não será, de facto, um produto final da glicação avançada, nem um *cross-link* de proteína. Apesar de FFI não ser um produto final da glicação avançada, a formação deste composto poderá, segundo os investigadores, ser usada como teste para identificação da formação espontânea de furosina durante a reacção de Maillard [97]. Numa data próxima do estudo de Njoroget et al., Hayase et al. [112] verificaram, igualmente, que o composto FFI representava um produto de clivagem, formado durante a hidrólise ácida do produto Amadori.

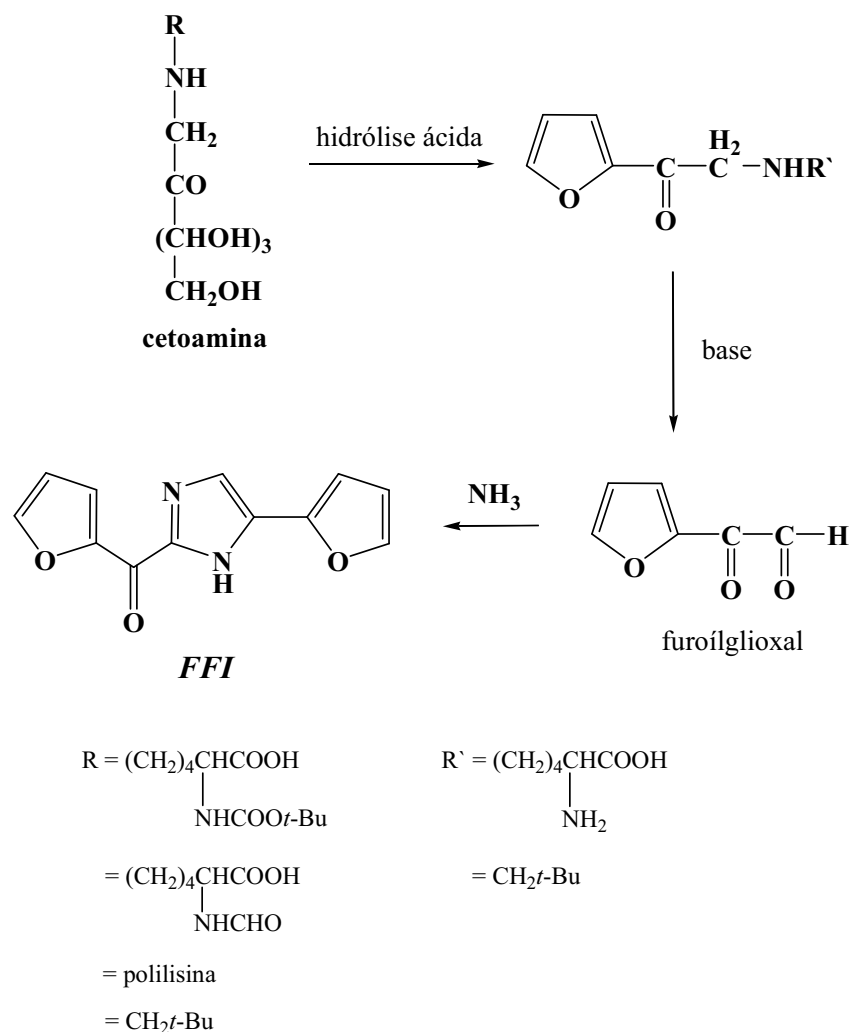


Figura 2.5. Mecanismo para a reacção de formação de FFI, a partir de proteínas glicadas (Ref. 97).

2.3.1.5.2. Pirralina e formas associadas.

Em 1987, Njoroge et al. [113] identificaram e caracterizam um composto formado durante o *browning* não-enzimático, em condições fisiológicas. Este composto tem na sua génese a reacção de grupos amina livres das proteínas com a glucose, e com a formação do intermediário 3-deoxiglucosona, o qual se pensa provir da degradação do produto Amadori (Fig. 2.6a) [113]. Este composto, que fora determinado ser lábil à hidrólise ácida, denomina-se pirralina. Kato et al. [114–118] tinham anteriormente observado a formação de um derivado da pirralina em misturas reactivas de butilamina e glucose, e de ϵ -amino lisina e glucose, a 100 °C. Posteriormente, Nissl et al. [119] identificaram a formação de pirralina na reacção da glucose com os compostos amina modelo, propilamina, N_α -acetil-L-lisina, e também com a albumina do soro bovino.

Numa data próxima do estudo anterior, Nagaraj et al. [120] verificaram que, quando da purificação da pirralina, o composto obtido, na reacção da lisina com a glucose, sofria degradação quando armazenado sob refrigeração, ou simplesmente quando exposto à temperatura ambiente. Na tentativa de identificação de possíveis produtos de degradação do composto pirralina, um dos produtos formados fora purificado. Com a elucidação da natureza estrutural deste produto de degradação, Nagaraj et al. [120] concluiu que se tratava de uma dipirralina, com uma ligação éter entre duas moléculas de pirralina (Fig. 2.6b). Esta descoberta levou os investigadores a estudar a reactividade da pirralina com tio- e hidroxí-aminoácidos [120]. Deste modo, verificou-se que os hidroxí-aminoácidos, em geral, não eram reactivos para com a pirralina. Porém, a reacção da cisteína com a pirralina resultou na formação de dois tioéteres distintos (Fig. 2.6b) [120]. Assim sendo, os resultados obtidos por Nagaraj et al. seriam fortes indicadores de que a pirralina formada *in vivo* poderia subsequentemente reagir com outros resíduos de aminoácidos, nas proteínas, de modo a originar a formação de produtos *cross-link*. Este fenómeno poderia explicar, em parte, o aumento do *cross-linking*, associado às complicações da diabetes *mellitus* e ao envelhecimento. A detecção da pirralina nas proteínas de tecidos, plasma, cristalino humano e de membranas tem sido conseguida, por recurso a métodos imunoquímicos e cromatográficos.

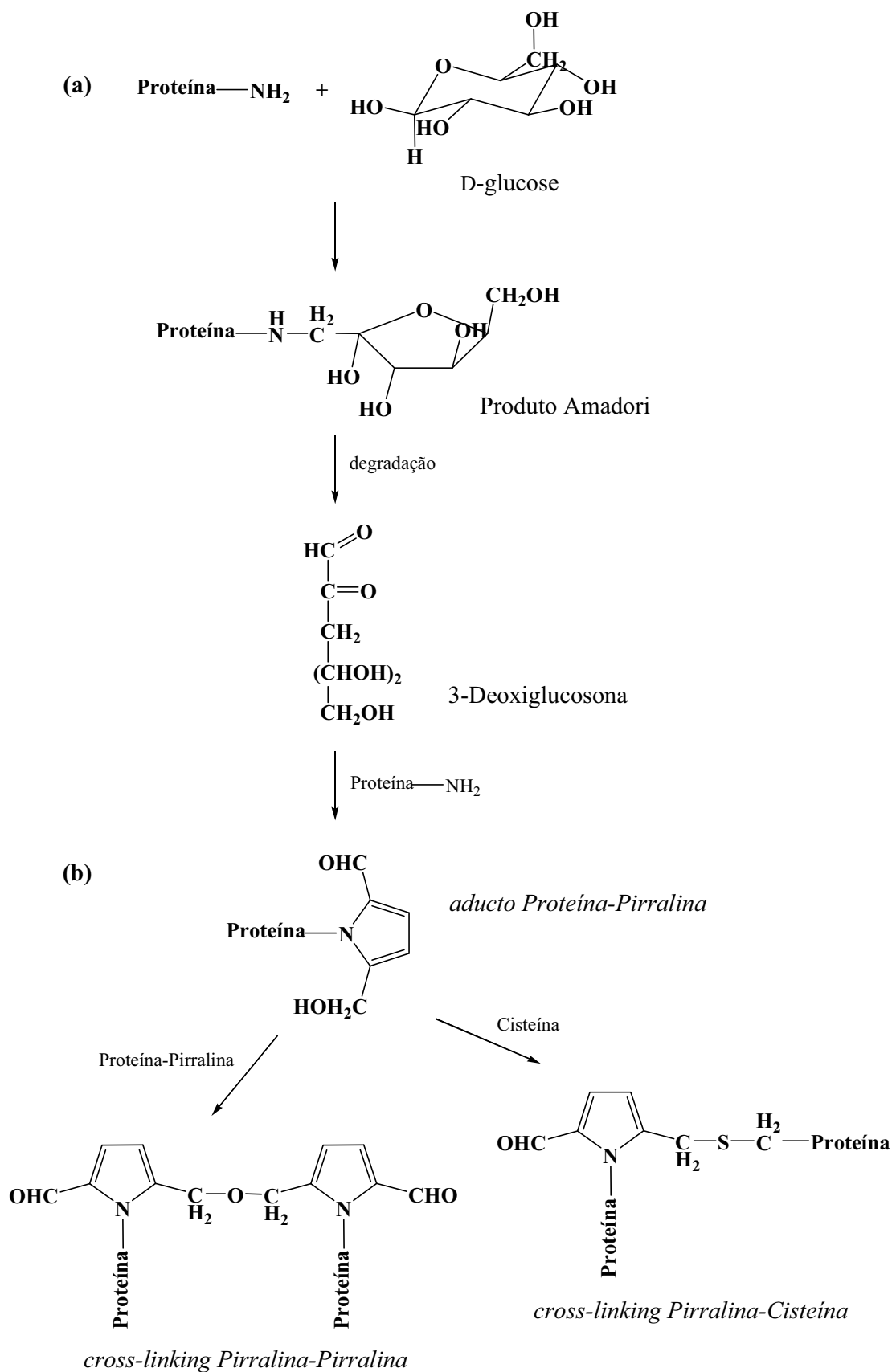


Figura 2.6. Mecanismo de reacção para a formação do AGE pirralina (a), e para a formação de outros *cross-links* pirralina (b) (Ref. 120).

2.3.1.5.3. Pentosidina.

Em 1989, Sell e Monnier [88], na base de uma investigação sistemática que visava a identificação da natureza da fluorescência observada no envelhecimento do colagénio humano, identificaram um novo AGE. Estes investigadores isolaram e elucidaram os aspectos estruturais de um composto fluorescente que se mostrava resistente à hidrólise ácida [88], ao contrário do composto pirralina [113]. Este composto *cross-link*, designado por pentosidina, tinha na sua formação a reacção de um resíduo de lisina, e de um outro de arginina, com uma pentose (Fig. 2.7a) [88]. Ao AGE pentosidina tem sido atribuído um importante significado na investigação gerontológica¹ [88]. Em primeiro lugar, a formação da pentosidina pode contribuir para a degradação dos tecidos envelhecidos, devido à sua acção *cross-linking* na matriz extracelular. Em segundo lugar, a pentosidina pode servir como marcador molecular para o processo de envelhecimento, e a sua detecção pode facilitar o estudo da longevidade e dos efeitos nocivos dos sistemas Maillard que envolvem pentoses. É de referir que sendo a pentosidina um *cross-link*, e tendo na sua constituição dois resíduos básicos de aminoácidos, os efeitos na estrutura e na função das proteínas modificadas podem ser bastante acentuados, o que pode proporcionar uma fácil detecção deste composto *in vivo*, sobretudo no que respeita aos processos de doença relacionados com a sua formação. Paralelamente à descoberta de Sell e de Monnier, Dyer et al. [101] identificaram um composto fluorescente, designado por produto fluorescente de Maillard (MFP-1), formado nas reacções da glucose com proteínas modelo *in vitro*, o qual fora observado que se acumulava em proteínas do tecido, relacionadas com o envelhecimento e com a progressão das complicações da diabetes *mellitus*. Os investigadores concluíram que o composto MFP-1 possuía, de facto, uma estrutura análoga ao composto pentosidina, identificado por Sell e Monnier [88]. Ainda no estudo de Dyer et al. [101], fora observado que a formação da pentosidina era abundante em sistemas modelo, como as reacções de pentoses com lisina e arginina, embora também fosse observada a partir da glucose, frutose, ascorbato, compostos Amadori, 3-deoxiglucosona, e de outros açúcares. Todavia, a pentosidina não se formou a partir do malondialdeído, nem de ácidos gordos poliinsaturados resultantes da peroxidação lipídica [101]. A formação da pentosidina, por reacção de açúcares, fora inibida em condições anaeróbicas, bem como na presença de aminoguanidina, sendo este último

¹ A *gerontologia* é um campo de estudos interdisciplinar que investiga os fenómenos fisiológicos, psicológicos e sociais relacionados com o envelhecimento do ser humano.

composto um conhecido inibidor da glicação avançada e das reacções *browning* [101]. Com estes resultados, é possível deduzir que a formação do composto pentosidina deverá envolver a reacção de intermediários de açúcares em condições reaccionais oxidativas. Em 2001, Chellan e Nagaraj [102] propuseram um novo mecanismo para a formação da pentosidina (Fig. 2.7b). Os investigadores sugeriram que duas ou três moléculas de carbohidrato (gliceraldeído), eventualmente formadas durante a clivagem oxidativa de produtos iniciais da reacção de Maillard, estão envolvidos na formação da pentosidina (Fig. 2.7b) [102]. Em relação à formação da pentosidina *in vivo*, Odetti et al. [121], em 1991, constataram que os níveis de pentosidina nas proteínas do plasma eram elevados em estados de uremia, em comparação com a diabetes, apesar de não se notar um aumento dos níveis de açúcar no sangue no que respeita à primeira patofisiologia mencionada. No entanto, Chatterjee e Banerjee [122], numa publicação de 1979, tinham notado um aumento dos níveis de ascorbato em indivíduos urémicos, o que suporta a evidência de Dyer et al. [101] de que a formação da pentosidina pode resultar da reacção de outros açúcares, e não unicamente de pentoses, como a ribose. Paralelamente à detecção da pentosidina, Bailey et al. [123], em 1995, constataram que *cross-links* fluorescentes adicionais podem ser observados nas reacções da glucose e ribose com o colagénio.

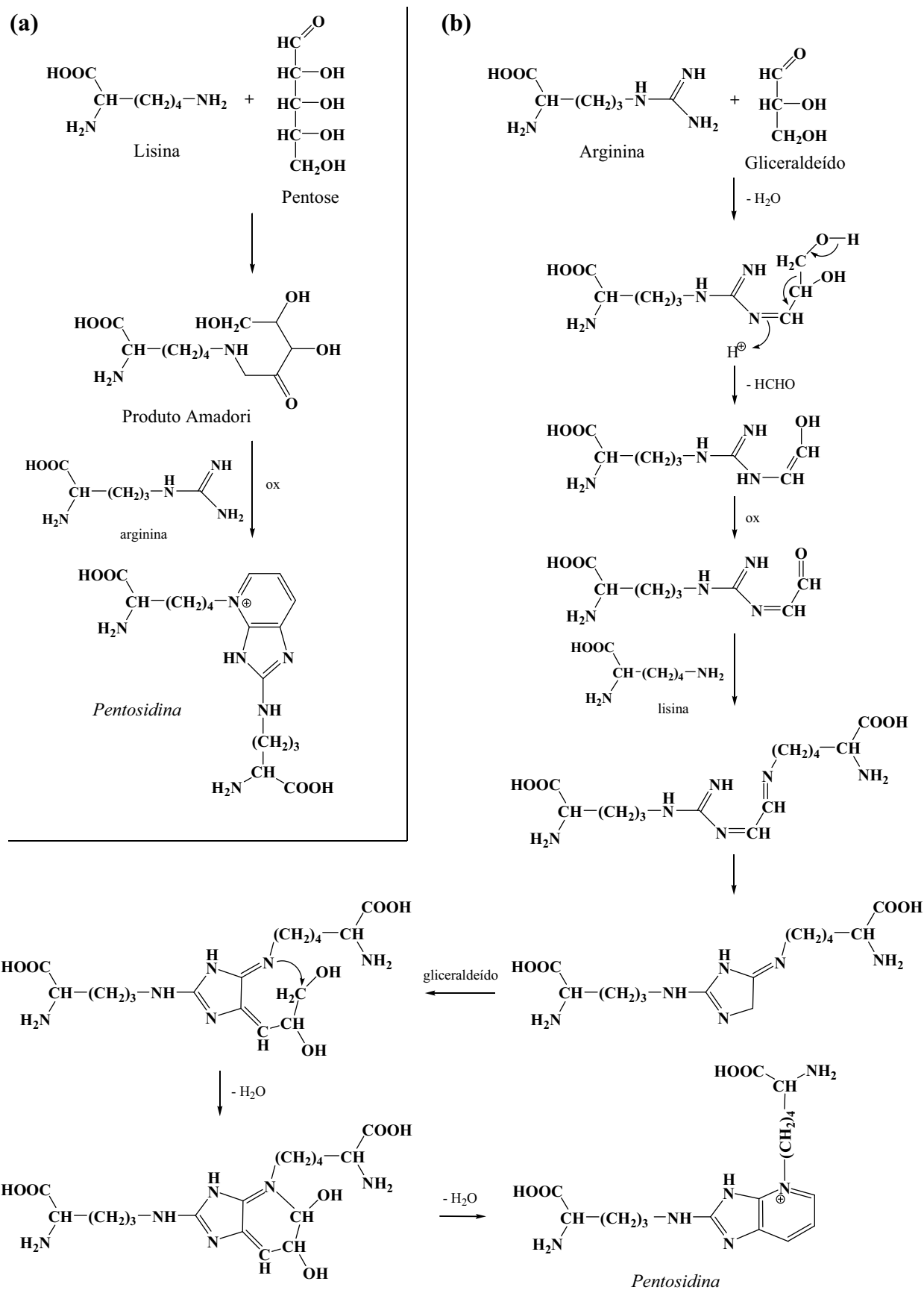


Figura 2.7. Mecanismos reaccionais propostos para a formação da pentosidina, através de pentoses (a) (Ref. 88) e de gliceraldeído (b) (Ref. 102).

2.3.1.5.4. CML e CEL.

Face ao citado anteriormente, também o grupo de Baynes, em paralelo com o grupo de Monnier, se interessou pelo estudo de intermediários, produtos de reacção e de mecanismos associados ao *browning* das proteínas e *cross-linking*, em especial no que respeita às fases finais da reacção de Maillard *in vivo*. Deste modo, Neglia et al. [124] observaram, por espectroscopia NMR ^{13}C , que as estruturas e as conformações de equilíbrio de aductos Amadori, nas proteínas, eram idênticas às obtidas para o composto Amadori modelo, N_{α} -formil- N_{ϵ} -frutoselisina (fFL). Pouco tempo depois, Ahmed et al. [87] estudaram as reacções de fFL e verificaram que o composto, N_{ϵ} -carboximetilisina (CML), corresponde ao produto maioritário, formado na degradação oxidativa do fFL, sendo também observada a formação de ácido eritrónico (EA) (Fig. 2.8). Ainda no mesmo estudo [87], os investigadores mostraram que o composto CML é formado ao nível das proteínas, nas condições vulgarmente usadas na glicação *in vitro*. Verificaram, também, que CML é detectado no colagénio e ao nível das proteínas do cristalino humano [87]. Em concordância com a formação do composto CML, resultante da clivagem oxidativa entre as posições C-2 e C-3 da cadeia do açúcar coordenado do produto Amadori fFL, Ahmed et al. [86] identificaram posteriormente uma nova série de produtos formados na clivagem oxidativa de fFL, entre as posições C-3 e C-4 da cadeia do açúcar do produto Amadori, i.e. os compostos ácido láctico 3-(N_{ϵ} -lisino) (LL) e ácido D-glicérico (Fig. 2.8). Por cromatografia gasosa, os investigadores verificaram a detecção de LL em proteínas glicadas *in vitro*, e constatarem, igualmente, que LL é um produto natural, existente nas proteínas do cristalino humano e na urina [86]. Com resultados obtidos da clivagem oxidativa do produto de arranjo Amadori, fFL, em que a formação dos compostos CML e LL fora observada, conjuntamente com o facto de CML e LL terem sido observados *in vitro* e *in vivo*, é possível concluir que a degradação do produto Amadori, nas proteínas, constitui uma importante via reaccional nos processos de glicação *in vivo*.

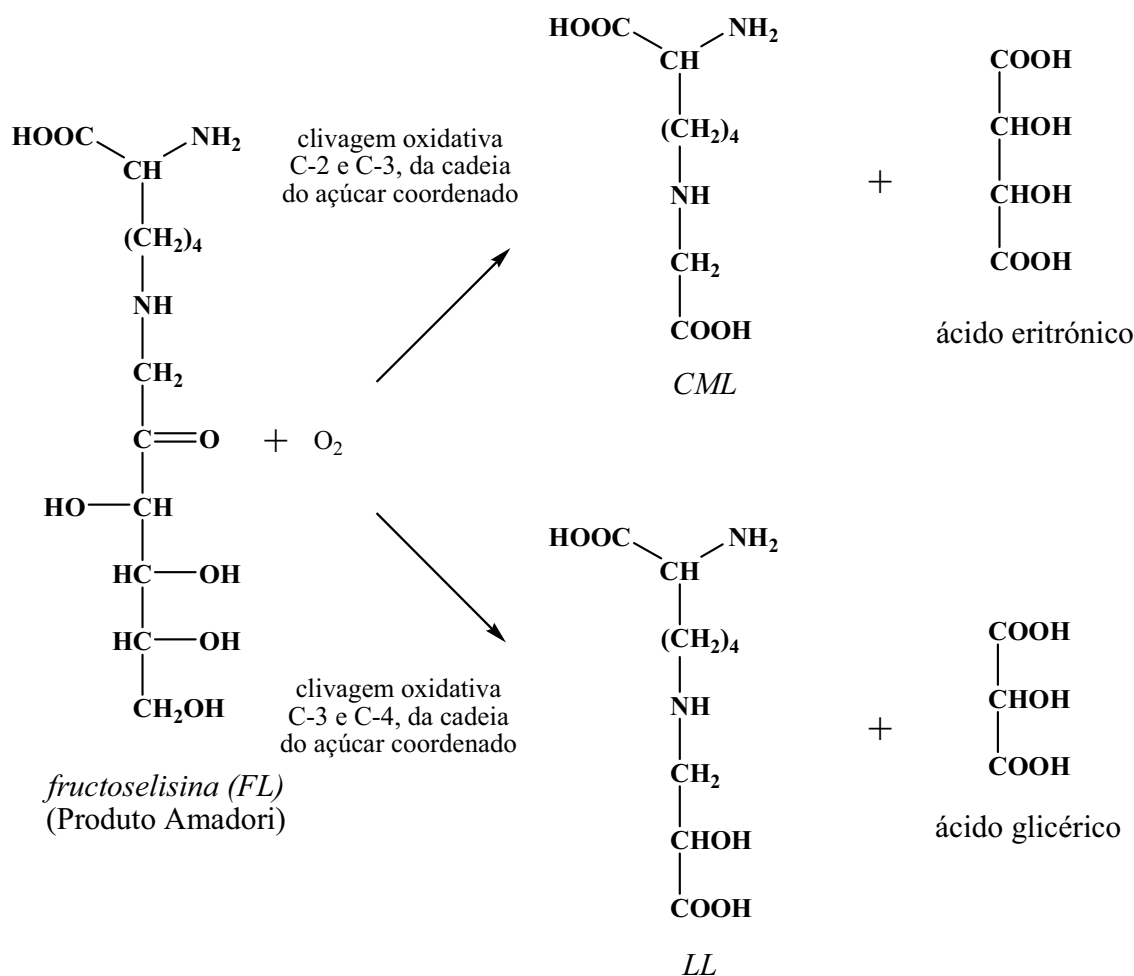


Figura 2.8. Via reaccionais envolvidas na degradação oxidativa da fructoselisin em proteínas glicadas – formação de CML e de LL (Ref. 86).

Posteriormente, Glomb e Monnier [57], estabeleceram a hipótese de que um mecanismo reaccional que envolvesse a formação de glioxal e de glicolaldeído poderia contribuir para a formação de CML e para o *cross-linking* de proteínas, em condições fisiológicas (Fig. 2.9). Assim, estes investigadores concluíram que a clivagem em C-2 da cadeia de açúcar de produtos precursores do produto Amadori (i.e. base de Schiff), constituindo uma via reaccional semelhante à proposta por Namiki [125] para a reacção de Maillard, poderá ter um papel importante na formação de CML e no *cross-linking* de proteínas. No que respeita à via reaccional proposta por Namiki [125], glioxal e glicolaldeído foram detectados como produtos de fragmentação Maillard, em sistemas reaccionais de açúcares e de alquilaminas a temperaturas elevadas [57]. Tendo em consideração o mecanismo reaccional proposto por Glomb e Monnier [57] (Fig. 2.9),

baseado nos resultados de Namiki [125], verifica-se que, apesar da formação do composto CML, a clivagem em C-2 da cadeia do açúcar da base de Schiff formada, na reacção do composto amina com açúcar, origina a formação de um composto aldoamina. Por sua vez, a aldoamina, ao reagir como uma outra molécula análoga, pode conduzir à formação de pirazinas, as quais são conhecidas por se oxidarem facilmente e por se fragmentarem, com formação de diiminas e de glioxal. A formação de diiminas, ou simplesmente de iminas, ao nível dos processos de glicação, pode originar *cross-linking* em proteínas. Glomb e Monnier [57] ao incubarem a albumina do soro bovino (BSA) com o glioxal e gliceraldeído, em condições fisiológicas, observaram a rápida formação de *cross-links* C-2-imina e de CML. A formação inicial de CML, a partir do glioxal, revelou ser independente da oxidação, sugerindo a ocorrência de uma reacção de Cannizzaro intramolecular. Ao invés, a formação de CML, a partir do sistema reaccional glucose/lisina ou do produto Amadori, mostrou-se fortemente dependente da oxidação. Os resultados obtidos por Glomb e Monnier divergem da hipótese anteriormente estabelecida, de que CML é apenas formado a partir do produto Amadori. Mais, recentemente [99], sabe-se que o composto CML pode ser formado *in vitro* por três vias reaccionais distintas: i) clivagem oxidativa de produtos Amadori, como referido anteriormente; ii) clivagem oxidativa de precursores de produtos Amadori, i.e. bases de Schiff; iii) modificação pelo glioxal formado, durante a degradação/autooxidação da glucose. Tem sido reportado que a clivagem oxidativa de produtos Amadori, responsável pela formação do composto CML, pode ser mediada por radicais hidróxilo e por peroxinitrito [99]. Propriedades do composto CML revelam que este é incolor, não fluorescente, e que não forma aductos *cross-link* nas proteínas. Devido à polaridade da sua cadeia lateral e densidade de carga, CML poderá estar essencialmente localizado na superfície de uma grande variedade de proteínas glicadas, e deste modo constituir-se como um importante antigénio, pelo que é usual ser reconhecido por acção de anticorpos anti-AGE [126]. Como referido CML é, em parte, abundante ao nível do colagénio da pele [127] e na urina [89]. Além disso, a concentração de CML nas proteínas do cristalino humano aumenta consideravelmente com o envelhecimento dos tecidos [127,128]. Também os níveis de CML se correlacionam com a severidade das complicações da diabetes *mellitus*, em particular com a retinopatia e a nefropatia [53,129].

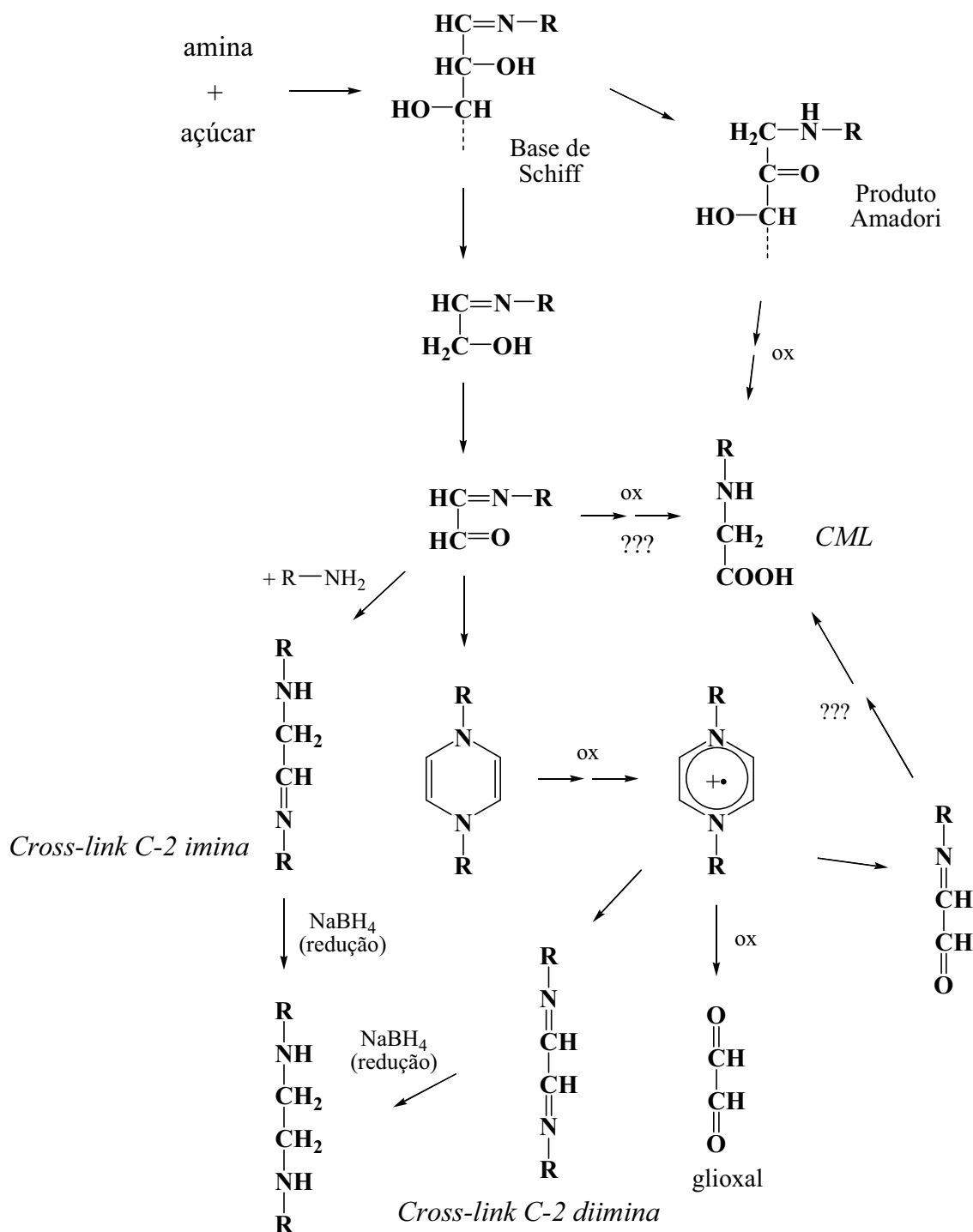


Figura 2.9. Mecanismo reaccional proposto para a formação de CML e de *cross-links* imina, ao nível da reacção de Maillard (Ref. 57).

Ahmed et al. [130] (grupo de Baynes), em 1997, descreveram a formação de um novo produto da glicação avançada, o composto de N_ϵ -(carboxietil)lisina (CEL), na reacção do metilglioxal com os resíduos de lisina em compostos modelo e em proteínas

do tipo ribonuclease (RNase) e colagénio. CEL foi também detectado nas proteínas do cristalino para uma concentração semelhante à observada para CML [130]. Além disso, verificou-se que os níveis de CEL aumentam com o envelhecimento, tal como fora observado para os níveis de CML. Apesar da importante formação de CEL ter sido observada na reacção do metilglioxal e trioses fosfato com lisina e proteína, este AGE fora igualmente observado nas reacções de pentoses, ascorbato e de outros açúcares com lisina e RNase [130]. Relativamente à origem de CEL *in vivo*, e em semelhança com CML, é expectável que CEL seja formado não-enzimaticamente por uma variedade de precursores, como a glucose, glucosona, 3-deoxiglucosona, ácido ascórbico, ribose, gliceraldeído 3-fosfato, dihidroxiacetona fosfato e metilglioxal, sendo os três últimos substratos mencionados os mais eficientes na produção de CEL [130]. Ao invés, os cinco primeiros substratos mencionados, glucose, glucosona, 3-deoxiglucosona, ácido ascórbico e ribose, podem ser mais eficientes na formação do composto homólogo de CEL, i.e. CML [130]. Todavia, os mecanismos possíveis para a formação de CEL a partir do metilglioxal incluem o rearranjo de Cannizzaro [131], e subsequentes reacções de hidratação e de desidratação [132,133]. Porém, não existe evidência clara se a formação de CEL, a partir da 3-deoxiglucosona, se processa numa fase inicial da reacção do açúcar com os resíduos lisina nas proteínas, isto é se por clivagem de produtos formados ou por decomposição do derivado de açúcar de modo a originar a formação de metilglioxal, o qual, por sua vez, ao reagir com a proteína, conduz à formação de CEL [130]. A formação de CEL, envolvendo trioses fosfato, pode proceder quer pela reacção directa de grupos amina com a triose fosfato, seguida pela eliminação do grupo fosfato, quer de forma espontânea ou por decomposição das trioses fosfato, i.e. catalisada pela amina, de modo a produzir metilglioxal [130]. Nagai et al. [134] demonstraram que apenas a incubação da proteína BSA, com o α -oxoaldeído metilglioxal, conduziu à formação do AGE CEL, ao invés das incubações com glioxal, glucosona e com 3-deoxiglucosona [134]. Com estes resultados é possível concluir, em termos de uma via não-enzimática para a formação do metilglioxal e de CEL, que o metilglioxal é produzido na reacção da lisina modificada com a glucose, e que este α -oxoaldeído é, numa série de possíveis produtos de degradação de açúcar e de intermediários Maillard, o único responsável pela formação de CEL em proteínas modificadas (Fig. 2.10) [134]. Apesar de estudos recentes indicarem que o metilglioxal, que se pensa ser produzido segundo as vias Embden-Meyerhof e poliólica, reage com lisinas modificadas e proteínas para formar CEL *in vivo* [135,136], a via reaccional

responsável para a formação de CEL, na reacção de Maillard, não foi ainda demonstrada. Todavia, é possível enunciar duas vias possíveis para a formação de CEL na reacção de Maillard (Fig. 2.10) [134]. Na primeira via, CEL pode ser produzido directamente por clivagem da base de Schiff (designada por via de Namiki) e do produto Amadori, sendo, por isso, semelhante ao constatado para a formação oxidativa de CML (Fig. 2.10) [86,134]. Na segunda via reaccional, o metilglioxal é produzido pela clivagem da base de Schiff e na degradação da glucose, reagindo, por sua vez, com lisinas modelo e proteínas para formar CEL (Fig. 2.10) [134]. Em concordância com o enunciado para a reacção de Maillard, a via de formação do AGE CEL *in vivo* encontra-se fracamente compreendida [134].

Um composto, estruturalmente análogo aos AGEs CML e CEL, fora identificado por Cai e Hurst [137] (1999), quando da modificação da proteína hemoglobina (Hb). O composto é o aducto *N*-(carboximetil)valina (CMV), tendo sido identificado por recurso a técnicas hifenadas (GC-MS).

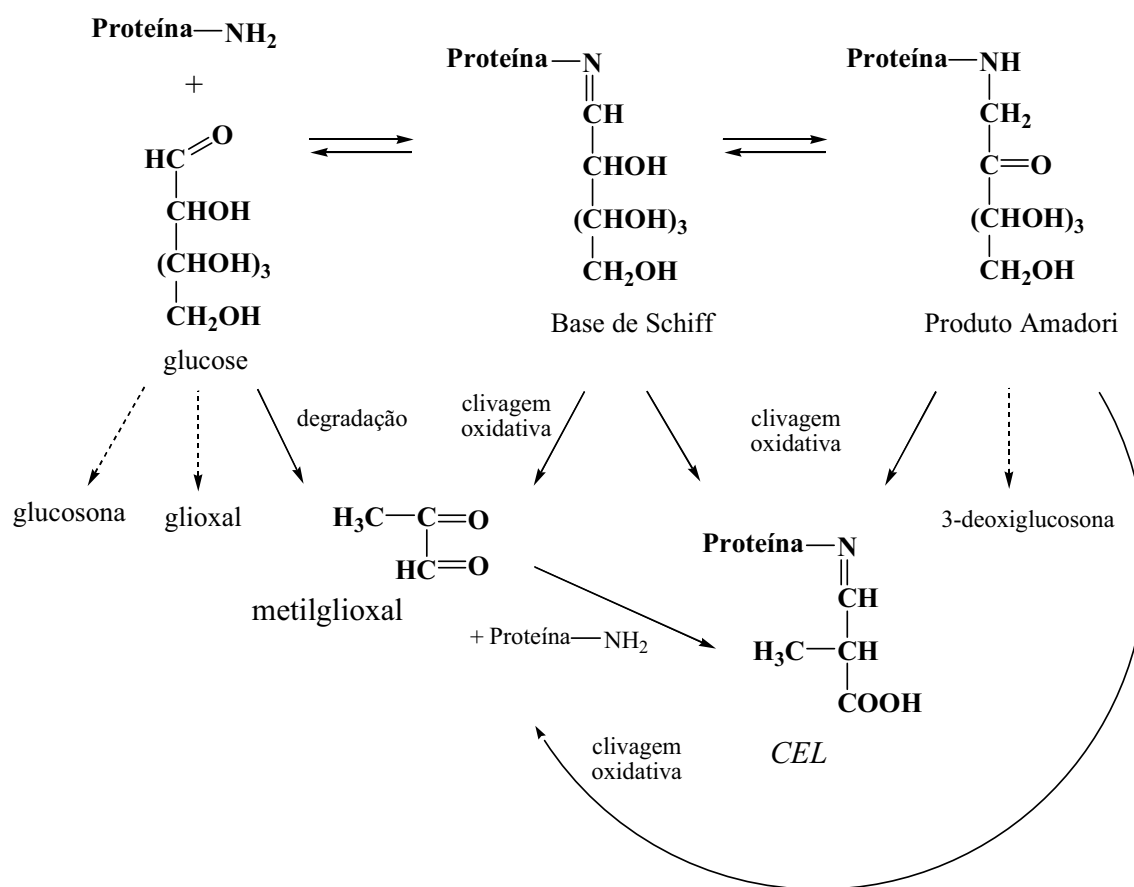
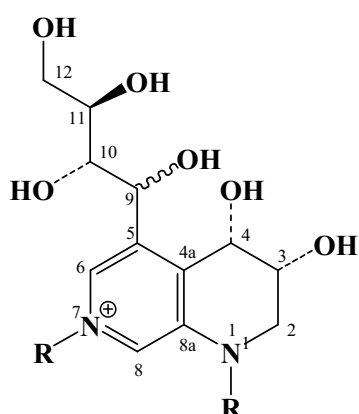


Figura 2.10. Via reaccionais possíveis para a formação de CEL na reacção de Maillard (Ref. 134).

2.3.1.5.5. Crosslines e vesperlisinas.

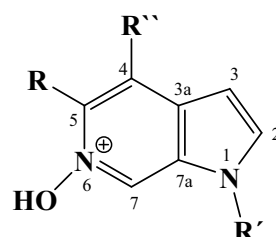
Na década de noventa, Nakamura et al. [138] isolaram e caracterizaram dois compostos fluorescentes, denominados *crosslines* A e B (Fig. 2.11). Estes compostos foram detectados na reacção de um aminoácido modificado, N_{α} -acetil-L-lisina, com D-glucose, em condições fisiológicas [138]. Estruturalmente, *crosslines* A e B assemelham-se ao composto pentosidina [88], sobretudo no que respeita à formação de uma estrutura bicíclica e à presença de duas cadeias laterais de aminoácidos (Figs. 2.7 e 2.11) [138]. Neste último trabalho, os investigadores afirmaram que os *crosslines* fluorescentes A e B, eram os primeiros candidatos AGE a possuírem características de fluorescência semelhantes aos produtos Maillard *in vivo* [138]. Isto deveu-se ao facto, de os *crosslines* fluorescentes A e B possuírem comprimentos de onda, para a emissão e para a excitação de radiação (excitação a 379 nm / emissão a 463 nm), semelhantes aos valores de fluorescência usualmente medidos nos sistemas de proteínas glicados *in vivo* (excitação a 370 nm / emissão a 440 nm). Mesmo o espectro de fluorescência da pentosidina (excitação a 335 nm / emissão a 385 nm) é substancialmente diferente do das proteínas glicadas *in vivo*, e, por isso, também difere do espectro de fluorescência obtido para os *crosslines* A e B. Posteriormente, Obayashi et al. [139] estudaram a relação da formação dos compostos *crossline* com a glicação de proteínas *in vivo*. De facto, estudos imunoquímicos realizados revelaram que estruturas *crossline* análogas se acumulam nos tecidos renais de ratos com nefropatia e retinopatia diabéticas [139]. Apesar da evidência imunoquímica das estruturas *crossline* na glicação *in vivo*, não tem sido possível obter informação quantitativa para o composto, por forma a discriminar a importância do *crossline* *in vivo*. Este facto deve-se às estruturas *crossline* se revelarem demasiado lábeis em meio ácido, o que inviabiliza o seu isolamento directo a partir dos tecidos hidrolisados. Este facto fora também observado para o AGE pirralina [113], e contribui, em grande medida, para um menor interesse no estudo destes AGEs, pirralina e *crossline*, sobre os efeitos da glicação *in vivo*. Posteriormente, Nakamura et al. [140] (1997) identificaram e caracterizaram as estruturas de vários produtos fluorescentes, formados na reacção de uma amina apropriada (*n*-pentilamina ou L-lisina) na presença de D-glucose, D-frutose, D-manose, D-ribose, DL-eritrose, 3-deoxiglucosona, dímero de glicolaldeído, gliceraldeído e de ácido ascórbico, em condições fisiológicas. Os produtos fluorescentes identificados neste estudo, correspondem aos compostos vesperlisina A, e ao seu derivado metílico vesperlisina B, e verperlisina C (Fig. 2.11) [140]. Estruturalmente, as verperlisinas identificadas representam produtos *cross-link*

entre dois resíduos de lisina, e pensa-se serem formados por degradação oxidativa da glucose. Estes produtos são, na verdade, estruturalmente semelhantes ao AGE pentosidina, ao qual fora reconhecido para a sua formação o envolvimento de formas açúcar de baixa massa molecular, como o gliceraldeído (Figs. 2.7b e 2.11) [102]. Nesta publicação, os investigadores incubaram a albumina do soro bovino (BSA) com glucose, em condições fisiológicas, e procederam à identificação dos compostos fluorescentes, anteriormente detectados ao nível das reacções modelo estudadas [140]. Na verdade, as verperlisinas A, B e C foram identificadas e isoladas, como sendo os compostos mais fluorescentes detectados a partir da hidrólise ácida da proteína BSA, modificada pela glucose [140]. Em geral, existe uma relação entre o espectro de proteínas glicadas *in vitro* e *in vivo*, e o espectro característico de determinados fluoróforos, como é o caso do *crossline* e das verperlisinas, observados em misturas reaccionais Maillard [138–140].



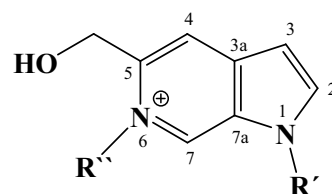
Crossline A: $R = (CH_2)_4CH(NH_2)COOH$; C9 (*R*)

Crossline B: $R = (CH_2)_4CH(NH_2)COOH$; C9 (*S*)



Vesperlisina A: $R', R'' = (CH_2)_4CH(NH_2)COOH$; $R = H$

Vesperlisina B: $R', R'' = (CH_2)_4CH(NH_2)COOH$; $R = CH_3$



Vesperlisina C: $R', R'' = (CH_2)_4CH(NH_2)COOH$

Figura 2.11. Estruturas dos compostos Crosslines A e B (Ref. 138), e dos compostos Vesperlisinas A, B e C (Ref. 140).

2.3.1.5.6. Glucosepano, pentosinano, DOGDIC e DOPDIC. Reinvestigação do AGE pentosidina.

Com a noção de que o *cross-linking* em proteínas representa uma das consequências mais relevantes da reacção de Maillard em proteínas de longa vida, surgiu, também, a necessidade de se aprofundar o conhecimento dos aspectos da mecanística reaccional envolvida na formação destes aductos. As estruturas *cross-link* descritas na literatura, têm na sua formação o envolvimento de formas açúcar, como as pentoses, ácido desidroascórbico, e derivados carbonílicos de baixa massa molecular, como os compostos α -dicarbonilo. É sabido que apesar da evidência de que estruturas *cross-linking* promovem alterações ao nível da estrutura e da função das proteínas, tem sido, de facto, questionado se as baixas concentrações observadas para estes *cross-links*, no plasma e em tecidos, suportam, as importantes modificações observadas nas proteínas, ou mesmo se as estruturas *cross-link* descritas na literatura podem ser racionalizadas como as estruturas *cross-link* mais relevantes na glicação. Nesta linha de abordagem, Lederer e Bühler [75] (1999) detectaram a formação de várias estruturas *cross-link*, como o composto glucosepano, ao nível da reacção modelo da lisina e da arginina modificadas, N_α -acetil-L-lisina e N_α -acetil-L-arginina, respectivamente, com D-glucose, e na incubação da albumina do soro bovino com D-glucose. Um derivado do glucosepano fora anteriormente identificado ao nível da reacção modelo da butilamina e da N_α -acetil-L-arginina com D-glucose [141]. O composto glucosepano identificado [75] assemelha-se estruturalmente ao composto pentosidina [57]. Propostas mecanísticas realizadas nestes estudos [75,141] iriam revelar-se inviáveis, em trabalhos posteriores do grupo [76], na medida em que a formação do composto glucosepano parece envolver uma maior mobilidade do agregado de açúcar na estrutura do produto Amadori.

Num estudo de desenvolvimento, dos trabalhos de Lederer e Bühler [75] e de Lederer et al. [141], Biemel et al. [76] identificaram e caracterizaram três novas estruturas *cross-link*, relativas aos compostos pentosinano, DOGDIC, DOPDIC, e elucidaram os aspectos das suas reacções de formação, tal como os da reacção de formação da pentosidina e do anteriormente referido composto glucosepano, na reacção de arginina e de lisina modificadas com glucose e arabinose (Fig. 2.12). Os compostos DOGDIC e DOPDIC foram identificados na reacção de lisina e de arginina modificadas com derivados de 3-deoxiosona, 3-DOG e 3-DOP, sendo estes últimos produzidos na reacção dos aminoácidos modificados com glucose e arabinose, respectivamente (Fig. 2.12) [76]. Todavia, na reacção do 3-DOG e do 3-DOP com lisina e arginina

modificadas não fora possível a identificação dos compostos pentosinano, glucosepano e pentosidina (Fig. 2.13) [76]. Os investigadores consideraram este resultado surpreendente, na medida em que a formação do anel de 6-membros no pentosinano e do de 7-membros no glucosepano parecia indicar que os derivados de 3-deoxiosonas deveriam ser precursores para a formação dos compostos referidos [75]. A referida ausência de glucosepano, pentosinano e de pentosidina nas misturas reaccionais de 3-DOG e 3-DOP, incluindo a das misturas de albumina de soro bovino, sugere a impossibilidade de DOGDIC e de DOPDIC serem precursores para a formação de pentosinano e de glucosepano, o que inviabiliza o mecanismo reaccional, anteriormente proposto por Lederer e Bühler, para a formação do glucosepano [75]. Enquanto que o glucosepano é uma estrutura AGE plausível em condições fisiológicas, o composto pentosinano não é tão estável, e origina a formação de pentosidina, por oxidação. Um aspecto importante no estudo de Biemel et al. [76] prende-se com a possível formação do composto pentosidina, a partir da forma pentosinano. Tendo em consideração que a formação de pentosidina é favorecida a pH alcalino, é possível deduzir-se o importante papel da catálise básica neste contexto [100]. Relativamente ao mecanismo proposto por Chellan e Nagaraj [102], a formação de pentosidina envolve a reacção de resíduos de lisina e de arginina com gliceraldeído (Fig. 2.7b). Pelo que, à luz dos resultados obtidos por Biemel et al. [76], qualquer mecanismo reaccional baseado na reacção consecutiva de intermediários carbonílicos, normalmente presentes em concentrações baixas ao nível fisiológico, parece ser pouco viável. Ainda no estudo de Biemel et al. verificou-se através do uso de glucose marcada, que existe retenção da cadeia de açúcar ao nível da formação dos compostos pentosinano, glucosepano, pentosidina, DOGDIC e DOPDIC [76]. A formação de glucosepano, pentosinano e pentosidina, através de fragmentos de açúcar, ocorreu de forma minoritária [76]. Na incubação da albumina do soro bovino com D-glucose ou D-arabinose, os investigadores observaram a formação das várias unidades de *cross-links* em quantidades semelhantes, apesar da proporção destes *cross-links* aumentar ao nível da incubação da D-glucose, em particular [76]. Verificou-se, igualmente, na incubação da proteína com D-glucose, que a formação do pentosinano diminuía com o progresso da reacção, devido à formação de pentosidina, em comparação com a incubação da D-arabinose.

Em virtude de no estudo de Biemel et al. [76] não existir evidência para a formação do glucosepano e pentosinano (formas bicíclicas) através da reacção das formas hidroimidazolona imina, como DOGDIC e DOPDIC, respectivamente, nem dos

correspondentes derivados de deoxiosona 3-DOG e 3-DOP, foram enviados esforços para a racionalização da formação dos anéis de 7-membros e de 6-membros, nos compostos glucosepano e pentosinano. Assim, num desenvolvimento deste estudo, Biemel et al. [77] (2002) identificaram, por recurso a uso de reacções modelo, novos intermediários, i.e. os compostos dideoxiosonas, na reacção de formação dos compostos glucosepano e pentosinano (Fig. 2.13). Estes intermediários de dideoxiosonas, existentes em quantidades superiores às observadas para os derivados de deoxiosona, por ciclização intramolecular, conduzem à formação da forma aldimina cíclica [77]. Por sua vez, este intermediário aldimina ao reagir com arginina origina a formação de glucosepano (Fig. 2.13a) [77]. O mecanismo reaccional proposto para a reacção de formação de pentosinano (Fig. 2.13b) é semelhante ao referido atrás (Fig. 2.13a). De facto, a importância de derivados de dideoxiosonas não se restringe à formação do glucosepano, como também é esperada na formação de outros produtos Maillard [77]. Interessante, neste estudo de Biemel et al. [77], é a formação de anéis de 6- e 7-membros, através da migração de grupos carbonilo num longo alcance, e por consequente ciclização intramolecular (Fig. 2.13). Com estes estudos, sobre os aspectos da mecanística de vários *cross-links* lisina-arginina formados, em reacções iniciadas por hexoses e por pentoses, é possível inferir a importância da mobilidade da função dicarbonilo no desenvolvimento de estruturas mais estáveis e com actividade *cross-linking*. A mobilidade dos grupos carbonilo é consistente com a retenção da cadeia de açúcar ao nível do produto Amadori, o que, por conseguinte, reforça a importância deste produto ao nível dos processos reactivos Maillard, e, por sua vez, transfere uma menor importância para o envolvimento de espécies de açúcar de menor massa molecular, como os α -dicarbonilos, no contexto da glicação. Posteriormente, e num desenvolvimento deste estudo do grupo, Reihl et al. [142] identificaram um derivado de piridínio-carbaldeído, na reacção de D-glucose marcada (^{13}C) com lisina e aminoguanidina, em que o mecanismo reaccional proposto mostra claramente a importância da mobilidade de grupos carbonilo na formação de estruturas estáveis de produtos de reacção.

De uma forma geral, os esforços realizados na elucidação do mecanismo reaccional de unidades *cross-link*, estabelecidas como as estruturas formadas, mais relevantes ao nível da reacção de Maillard *in vitro* e *in vivo*, sugerem a extrema importância do produto Amadori, em detrimento da contribuição de formas açúcar menores, como os dicarbonilos, para a formação de estruturas AGE. Na verdade, poderá

ocorrer formação destas espécies de açúcar de baixa massa molecular, ao nível da degradação dos precursores base de Schiff e Amadori. Todavia, mesmo a possível formação destas espécies de açúcar não fora responsável pela formação de estruturas AGEs em quantidades significativas *in vivo* e *in vitro*. Apesar da importância do produto Amadori e da coerência mecanística de que a sua inclusão beneficia ao nível da formação das unidades *cross-link*, e.g. como no mecanismo proposto por Biemel et al. (Fig. 2.12) [76], convém não esquecer que poderá ocorrer sempre envolvimento de formas açúcar na reacção com grupos amina livres, e que estas formas açúcar de massa molecular inferior poderão ajudar na clarificação de determinados processos reaccionais, contribuindo assim para uma melhor compreensão dos complexos sistemas de reacções que incluem as formas açúcar nativas.

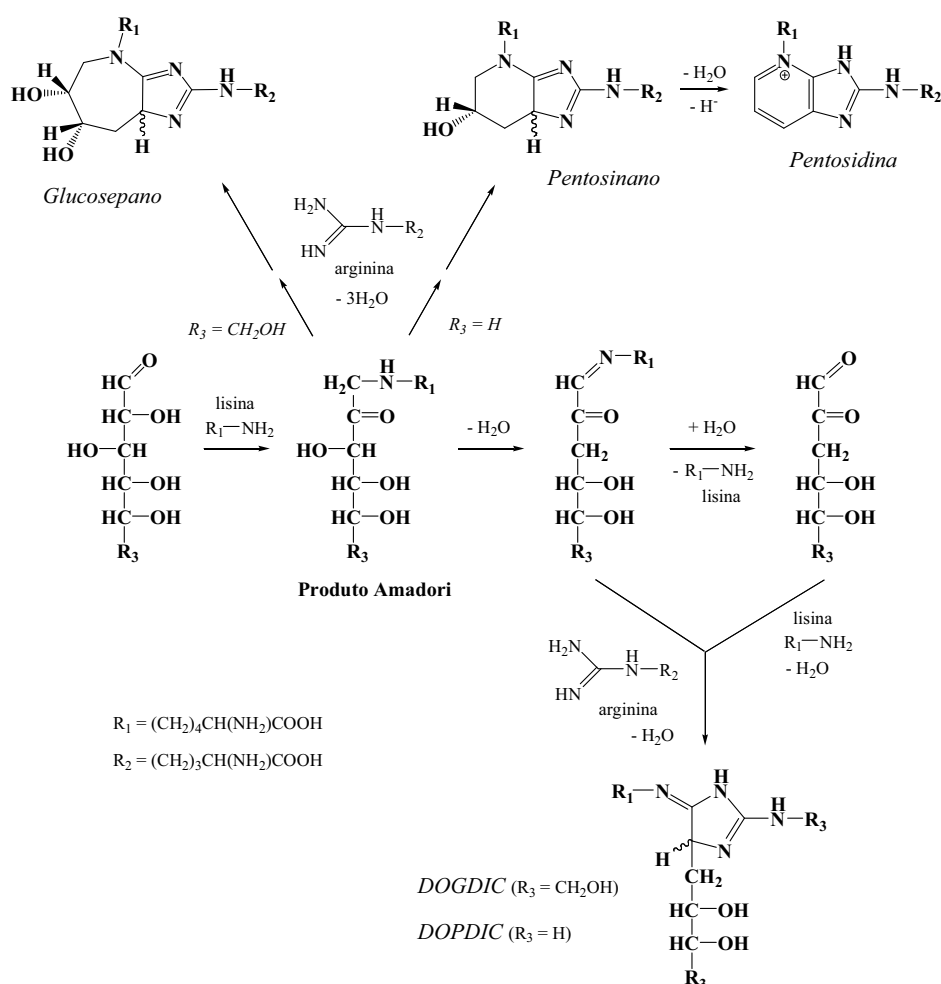


Figura 2.12. Vias reaccionais propostas para a formação de *cross-links* lisina-arginina (glucosepano, pentosinano, pentosidina, DOGDIC e DOPDIC) (Ref. 76).

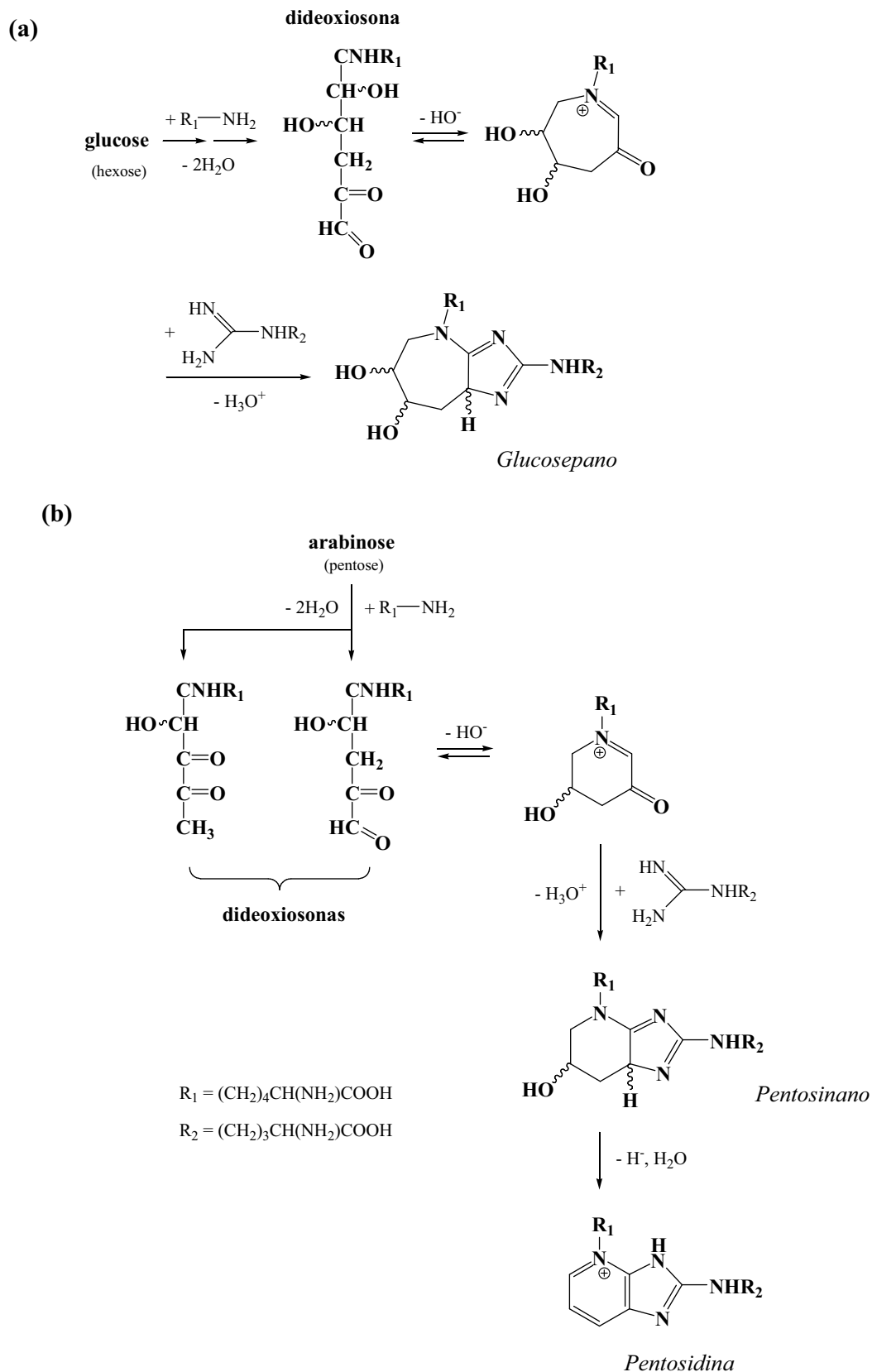


Figura 2.13. Mecanismo de reacção proposto para a formação dos *cross-links* lisina-arginina glucosepano (a) e pentosidina (b), com envolvimento de intermediários dideoxiosonas derivados para hexoses (a) e pentoses (b), respectivamente (Ref. 77).

2.3.1.5.7. GOLLA e GALA. Reinvestigação do AGE CML.

Glomb e Pfahler [98] (2001) apresentaram resultados interessantes sobre a importância de AGEs não fluorescentes do tipo amida ao nível do *cross-linking* de proteínas, verificando, contudo, que a formação de compostos do tipo amida, i.e. GOLLA e GALA, está relacionada com a formação do AGE CML [124]. Wells-Knecht et al. [131] reportaram a formação de GOLLA, como um produto da reacção de Maillard, embora não tenham apresentado meios de prova directos. Büttner et al. [142] identificaram estruturas análogas de GOLLA e de GALA, na reacção da ribose e da glucose com propilamina a 70 °C, em que no mecanismo de reacção proposto não existira indicação relativa ao envolvimento do glioxal ou de outros precursores dicarbonílicos. Ainda relativamente a outros compostos amida, Nagaraj et al. [143] identificaram o composto de oxalato de monoalquilamina, na reacção do ácido desidroascórbico com proteínas. Muito embora a evidência da formação de amidinas, ao nível da reacção de Maillard, os aspectos da sua natureza química não se encontram abordados. Glomb e Pfahler [98] propuseram um mecanismo reaccional para a formação de amidinas via intermediários α -dicarbonilo (Fig. 2.14). Neste mecanismo de reacção tem-se a formação das formas glioxal-imina e -diimina (Fig. 2.14) [98]. Na reacção da forma imina com uma molécula de lisina e/ou com uma molécula de água, tem-se a formação de estruturas do tipo enaminol, as quais por rearranjos consecutivos e oxidação conduzem à formação das formas amidina, GALA e GOLLA, e CML (Fig. 2.14) [98]. É de notar que uma das formas enaminol propostas ao nível do mecanismo de reacção, em particular a que resulta da reacção da forma glioxal-imina com lisina, ou simplesmente da forma glioxal-diimina, é prevista reagir subsequentemente com uma molécula de glioxal, originando, por libertação de uma molécula de ácido fórmico (HCOOH), a formação do sal de imidazólio GOLD (Fig. 2.14) [98]. Neste trabalho, os investigadores notaram que a formação de CML, GOLLA, GALA e GOLD fora completamente inibida em condições anaeróbias, o que levou a concluir que a síntese dos compostos mencionados requer química oxidativa [98]. Glomb e Pfahler dissecaram duas vias possíveis para formação de CML [98]. Deste modo, pensa-se que uma grande quantidade, do total de CML formado, é produzida pela fragmentação oxidativa do produto Amadori, ao passo que o restante CML pode resultar da formação de precursores glioxal-imina (Fig. 2.14). Tendo em consideração a formação dos compostos GOLLA e CML, aqueles investigadores concluíram que o inibidor aminoguanidina falha ao nível da inibição da formação de produtos resultantes da

reactividade do produto Amadori, e, em geral, de estruturas AGEs que tenham na sua formação o envolvimento do produto Amadori [98]. Na base dos resultados de Glomb e Pfahler, as amidas GOLA e GALA constituem novas modificações de proteínas. Em particular, GOLA, que fora preliminarmente detectado ao nível das proteínas do cristalino [98]. GOLA e GALA podem ser produzidos por qualquer açúcar capaz de produzir glioxal e produtos Amadori. Com seria de esperar, à estrutura GOLA é atribuído um interesse especial, na medida em que, no que respeita à fragmentação oxidativa do produto Amadori e à presença de precursores glioxal-imina, a sua formação inclui vias reaccionais semelhantes às previstas na síntese de CML. De uma forma geral, os aspectos mecanísticos propostos para as novas estruturas AGEs GOLA e GALA vieram, de facto, evidenciar a importância da formação de precursores glioxal-imina ao nível da glicação, e que estes precursores competem, conjuntamente com o produto Amadori, para a formação de estruturas amida, como é o caso de GOLA e de CML.

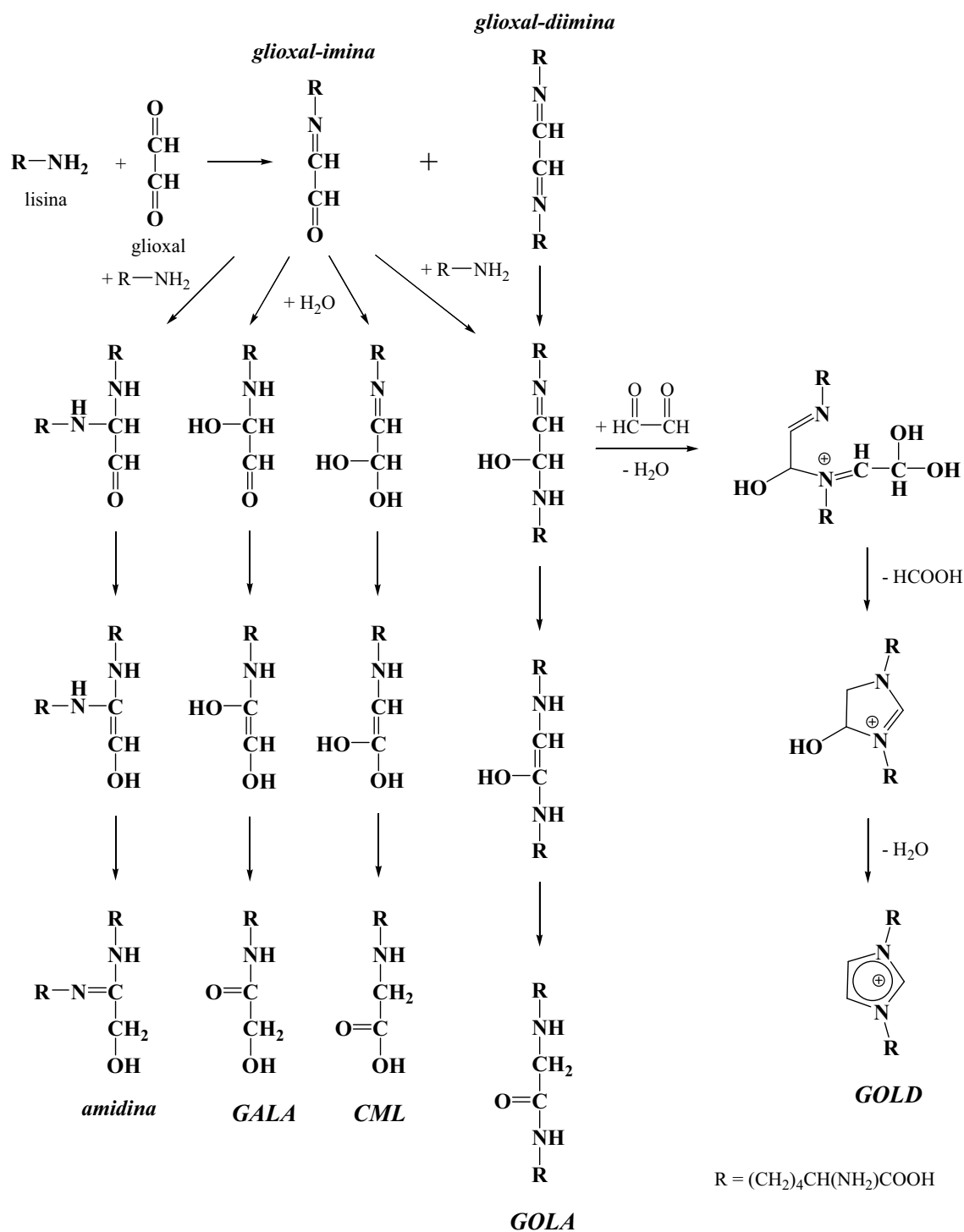


Figura 2.14. Mecanismo de reacção proposto para a formação de amidinas, e de estruturas amida GALA e GOLA, CML e GOLD, para os sistemas reaccionais glioxal/lisina (Ref. 98).

2.3.1.5.8. Desaminação oxidativa. Reacção de Strecker *in vivo*.

A degradação oxidativa de α -aminoácidos por α -dicarbonilos é um conhecido processo reaccional, designado por degradação de Strecker [3,144], reconhecido ao nível da química alimentar. Na degradação de Strecker [3,144], α -dicarbonilos derivados de açúcares, e o próprio açúcar glucose podem conduzir à degradação de α -aminoácidos, sobretudo a temperaturas elevadas, originando, por conseguinte, um composto aldeídico, com menos um átomo de carbono que o α -aminoácido inicialmente reagido. Compostos *o*-quinona, contendo estruturalmente um grupo α -dicarbonilo, são conhecidos por catalizar a desaminação oxidativa de aminas primárias, com formação das respectivas formas aldeídicas, em condições fisiológicas [145]. Determinados enzimas, como a lisil oxidase, são responsáveis por catalizar a desaminação oxidativa de determinados resíduos lisina presentes em proteínas de tecidos, como a elastina e o colagénio [146–149]. Compostos α -dicarbonilo, formados no curso da reacção de Maillard *in vivo*, por exemplo, podem constituir-se como potenciais oxidantes de aminas, incluindo possivelmente os resíduos de lisina nas proteínas. No decurso da desaminação oxidativa, tem-se a formação da espécie molecular α -aminoadipic- δ -semialdeído, ao nível dos resíduos de lisina modificados. É de notar que a formação da espécie α -aminoadipic- δ -semialdeído fora anteriormente observada ao nível da modificação de resíduos de lisina nas proteínas, pela acção de espécies radiculares de oxigénio (ROS, radicalar oxigen species) [150–152]. No decurso da própria reacção de Maillard pode existir a formação de espécies radiculares de oxigénio, i.e. na presença de condições aeróbias e na presença de metais de transição [102,153–155]. É sabido que algumas estruturas AGE têm, na sua formação, processos de química oxidativa [57,102,156,157]. Na literatura, é possível também destacar o papel do precursor α -aminoadipic- δ -semialdeído na formação de estruturas *cross-link* ao nível da elastina e do colagénio [147–149]. Suyama et al. [158] identificaram a formação do resíduo α -aminoadipic- δ -semialdeído nas proteínas do plasma de ratos, demonstrando, contudo, que os níveis de α -aminoadipic- δ -semialdeído se mostravam consideravelmente mais elevados no plasma de ratos diabéticos, em comparação com os resultados do controlo. De uma forma mais específica, estes investigadores exploraram a reacção de desaminação oxidativa, via reacção de Maillard, e demonstraram a ocorrência da oxidação dos resíduos de lisina na proteína BSA, quando da sua incubação com vários açúcares e na presença de Cu^{2+} , nas condições fisiológicas de temperatura e de pH [158]. No decurso destas experiências, os investigadores notaram que metilglioxal e 3-

deoxiglucosona são dos oxidantes mais eficientes para os resíduos de lisina [158]. Quando a reacção foi iniciada com glucose, observou-se uma quantidade substancial de α -aminoadipic- δ -semialdeído na presença de Cu^{2+} [158]. A formação de α -aminoadipic- δ -semialdeído pela glucose, 3-deoxiglucosona e metilglioxal foi inibida por desoxigenação das amostras, na presença de catalase, e de dimetilsulfóxido [158]. Nesta base dos resultados obtidos, Suyama et al. recorreram a uma reacção do tipo Strecker, por acção de α -dicarbonilos e por oxidação mediada por espécies reactivas de oxigénio, como suporte mecanístico para a desaminação oxidativa via reacção de Maillard. O mecanismo proposto pelos investigadores para a interpretação da formação de α -aminoadipic- δ -semialdeído a partir de resíduos lisina, segundo uma reacção do tipo Strecker, encontra-se representado na Fig. 2.15 [158]. Assim sendo, verifica-se que formação de espécies α -dicarbonilo pode ser induzida pela autooxidação da glucose, degradação de bases de Schiff e de produtos Amadori e por catálise mediada por iões metálicos (Fig. 2.15). Até esta fase do mecanismo reaccional não existem grandes diferenças, face ao mecanismo esboçado para a reacção de Maillard (Figs. 2.3 e 2.15). Subsequentemente, as espécies dicarbonilo mais reactivas, como os α -dicarbonilos, em particular metilglioxal e 3-deoxiglucosona, condensam-se com os resíduos de lisina para formar derivados de base de Schiff (iminocetonas – I) (Fig. 2.15). Posteriormente, por desprotonação em meio básico, e enolização, tem-se a forma iminoenaminol (II) (Fig. 2.15). O agregado iminoenaminol, por interacção com Cu^{2+} , segundo um processo de transferência electrónica, e por hidrólise espontânea, promove a libertação do anel do agregado enaminol (III), com formação do aldeído de α -aminoácido, α -aminoadipic- δ -semialdeído (IV) (Fig. 2.15). Ainda no estudo de Suyama et al., uma outra via possível para a formação de α -aminoadipic- δ -semialdeído, no contexto da reacção de Maillard, é a reacção mediada por espécies reactivas de oxigénio para a desaminação oxidativa [158].

De uma forma geral, a forma α -aminoadipic- δ -semialdeído tem sido reconhecida como um biomarcador para os danos oxidativos nas proteínas *in vivo*, uma vez que esta forma é produzida a partir dos resíduos de lisina nas proteínas e pela acção de espécies de radicais livres contendo oxigénio [150–152]. Quando o *stress* oxidativo é induzido em ratos, por tratamento com *t*-butilhidroperóxido, verifica-se que a concentração da forma de aldeído mencionada aumenta consideravelmente, em comparação com os resultados do controlo [150]. A quantidade de α -aminoadipic- δ -semialdeído nas proteínas do plasma mostra estar correlacionada com o envelhecimento dos ratos. É de

notar, como fora referido atrás, que a reacção de Maillard pode também representar uma fonte válida para a formação de α -aminoadipic- δ -semialdeído, devida à geração de espécies radicalares de oxigénio. A espécie α -aminoadipic- δ -semialdeído ao condensar-se com uma outra espécie equivalente, por condensação aldólica, ou com resíduos de lisina, via base de Schiff, pode originar a formação espontânea de *cross-links* inter- e intra-moleculares [159–164]. Deste modo, é possível deduzir que α -aminoadipic- δ -semialdeído pode constituir uma espécie precursora para a formação de *cross-links* de proteínas, de um modo semelhante ao da formação de AGEs *in vitro* e *in vivo*, e, por isso, pode ser relevante ao nível das complicações da diabetes e no envelhecimento. É de notar que o processo de desaminação oxidativa representa, de facto, uma intersecção entre os conceitos de glicação e glicoxidação, com particular ênfase para a relevância do *stress* oxidativo *in vivo*.

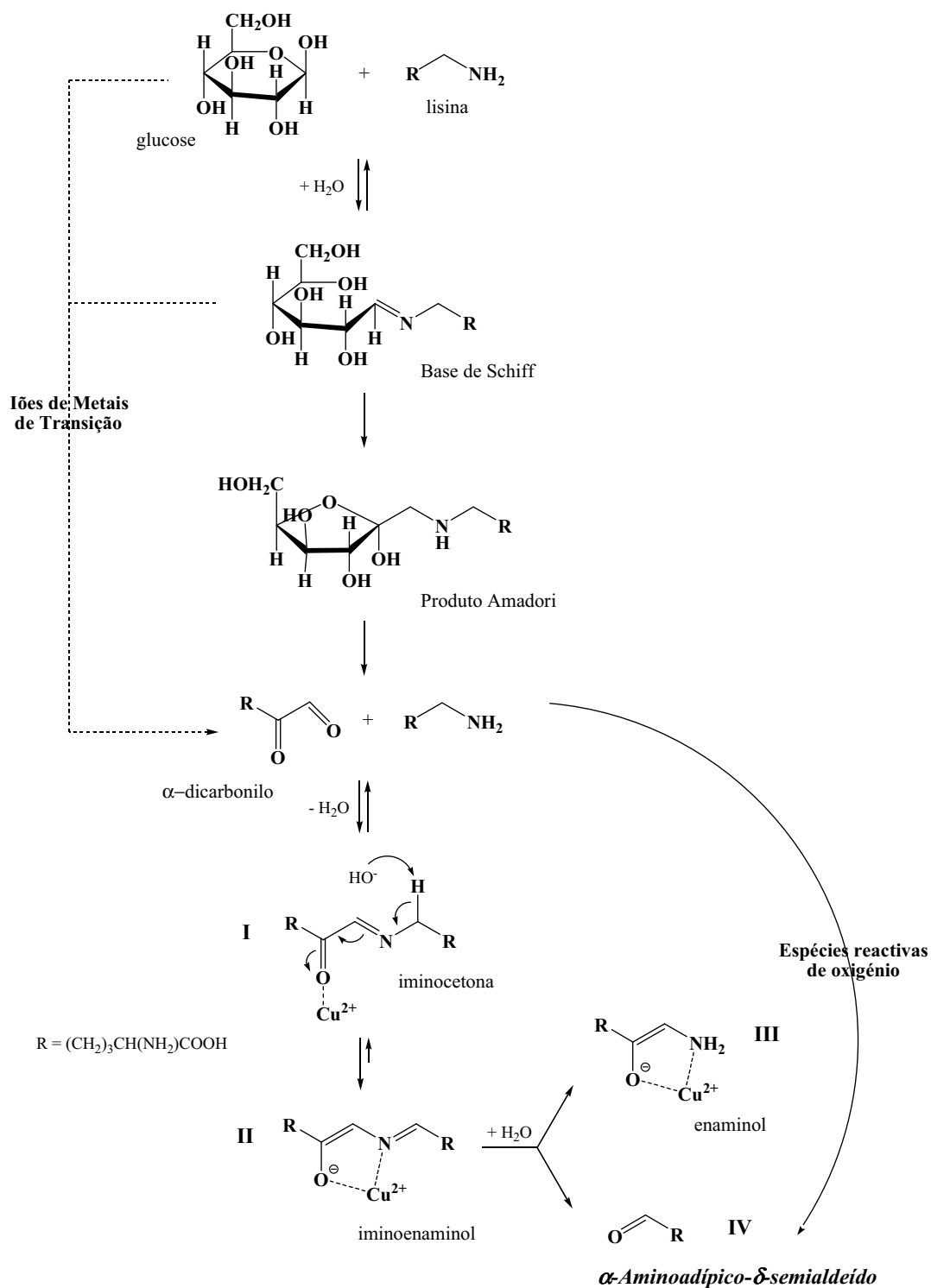


Figura 2.15. Mecanismo de reacção proposto para a desaminação oxidativa de resíduos lisina, segundo a adopção de uma reacção do tipo Strecker (Ref. 158).

2.3.1.6. Formação de AGEs via trioses, α -dicarbonilos e outros compostos carbonílicos de baixa massa molecular.

A formação de compostos α -dicarbonílicos, como é o caso do glicoxal, metilglicoxal e 3-deoxiglucosonas, tem sido observada ao nível da reacção de Maillard, quer por degradação das espécies de açúcar envolvidas (e.g. glucose), quer pela degradação de intermediários resultantes da reacção Maillard (base de Schiff e produto Amadori).

2.3.1.6.1. Hidroimidazolona e 5-metilimidazolona, derivadas para o metilglicoxal.

Por forma a melhorar a compreensão da cinética, e dos aspectos da natureza estrutural das espécies envolvidas nas reacções dos resíduos de arginina, lisina e cisteína, nas proteínas, com o metilglicoxal, Lo et al. [91] estudaram as reacção modelo de aminoácidos modificados, i.e. N_{α} -acetil-L-arginina, N_{α} -acetil-L-lisina e N_{α} -acetil-L-cisteína, com o metilglicoxal, na tentativa de caracterizar os seus processos cinéticos e aceder ao seu mecanismo reaccional (Fig. 2.16). Neste estudo, a reacção do metilglicoxal com a albumina do soro bovino fora, também, estudada, nas condições fisiológicas [91]. Assim sendo, os investigadores verificaram que a reacção do metilglicoxal com N_{α} -acetil-L-arginina progride com a formação inicial de uma glicosilamina, que por sua vez se converte numa dihidroimidazolidina, e com a formação lenta de um derivado de imidazolona fluorescente (5-metilimidazol-4-ona) (Fig. 2.16a) [91]. Concluiu-se ainda, neste estudo, que a formação da referida 5-metilimidazol-4-ona envolve a autooxidação espontânea do intermediário 1,5-dihidroimidazolona (hidroimidazolona) (Fig. 2.16a) [91]. Por sua vez, a reacção do metilglicoxal com N_{α} -acetil-L-lisina origina a formação reversível de uma glicosilamina (Fig. 2.16b) contudo, para concentrações elevadas de metilglicoxal, ocorre a formação de um complexo de cor castanha e de pigmentos fluorescentes [91]. Os investigadores deduziram que o complexo, formado por duas moléculas de N_{α} -acetil-L-arginina (AcLys) e por uma de metilglicoxal (MG), do tipo $(AcLys)_2MG$, pode sofrer desidratação e enolização, de modo a conduzir à formação de um aducto entre duas moléculas de AcLys, na forma de $RNH-CO-CHMe-NHR'$ (Me = metilo) (Fig. 2.16b) [91]. Este aducto formado constitui um *cross-link* não-sulfidrílico estável. Verificou-se que a reacção do metilglicoxal com N_{α} -acetil-L-cisteína evolui de forma reversível, embora apenas com formação da forma hemitioacetal (Fig. 2.16c). Por fim, a reacção do metilglicoxal com BSA originou a formação de produtos de reacção

reversível, no que respeita aos resíduos de arginina, lisina e de cisteína na proteína BSA, embora a formação de aductos de natureza reaccional irreversível tenha sido igualmente observada, sobretudo ao nível da modificação dos resíduos de arginina, pelo metilglioxal [91]. Todavia, não foram observadas alterações na mobilidade electroforética da proteína BSA modificada, apesar de ter existido evidência para a formação de uma pequena proporção de proteína oligomérica [91]. Relativamente aos sistemas modelo de aminoácidos estudados no trabalho de Lo et al., em especial os aminoácidos modificados N_{α} -acetil-L-arginina e N_{α} -acetil-L-lisina, não foram detectadas bases de Schiff, que estão normalmente envolvidas na formação de formas mais desidratadas dos precursores de dihidroxiimidazolidina identificados (Fig. 2.16) [91]. Lo et al. concluíram ainda que o metilglioxal pode modificar as proteínas, de forma reversível e irreversível, sobretudo ao nível do rim, cristalino, e ao nível de determinadas proteínas do sangue [91]. Esta ocorrência pode conduzir a um aumento da concentração do metilglioxal nos tecidos e no fluxo sanguíneo. É sabido que a concentração de metilglioxal no sangue de indivíduos com diabetes *mellitus* pode aumentar de 2–6 vezes, em comparação com os resultados obtidos no controlo. A elevada reactividade do metilglioxal com as proteínas, associada à sua concentração significativa no plasma sanguíneo, sugere que o metilglioxal constitui um intermediário comum na formação de AGEs *in vivo*. Esta afirmação pode ser igualmente suportada pelo facto de determinados macrofágos possuírem receptores específicos para as proteínas modificadas pelo metilglioxal, como também para proteínas modificadas pela glucose [165]. Esta importante descoberta contribui para estimular o desenvolvimento destes estudos e para uma melhor compreensão da importância, ao nível fisiológico, do metilglioxal na modificação de proteínas.

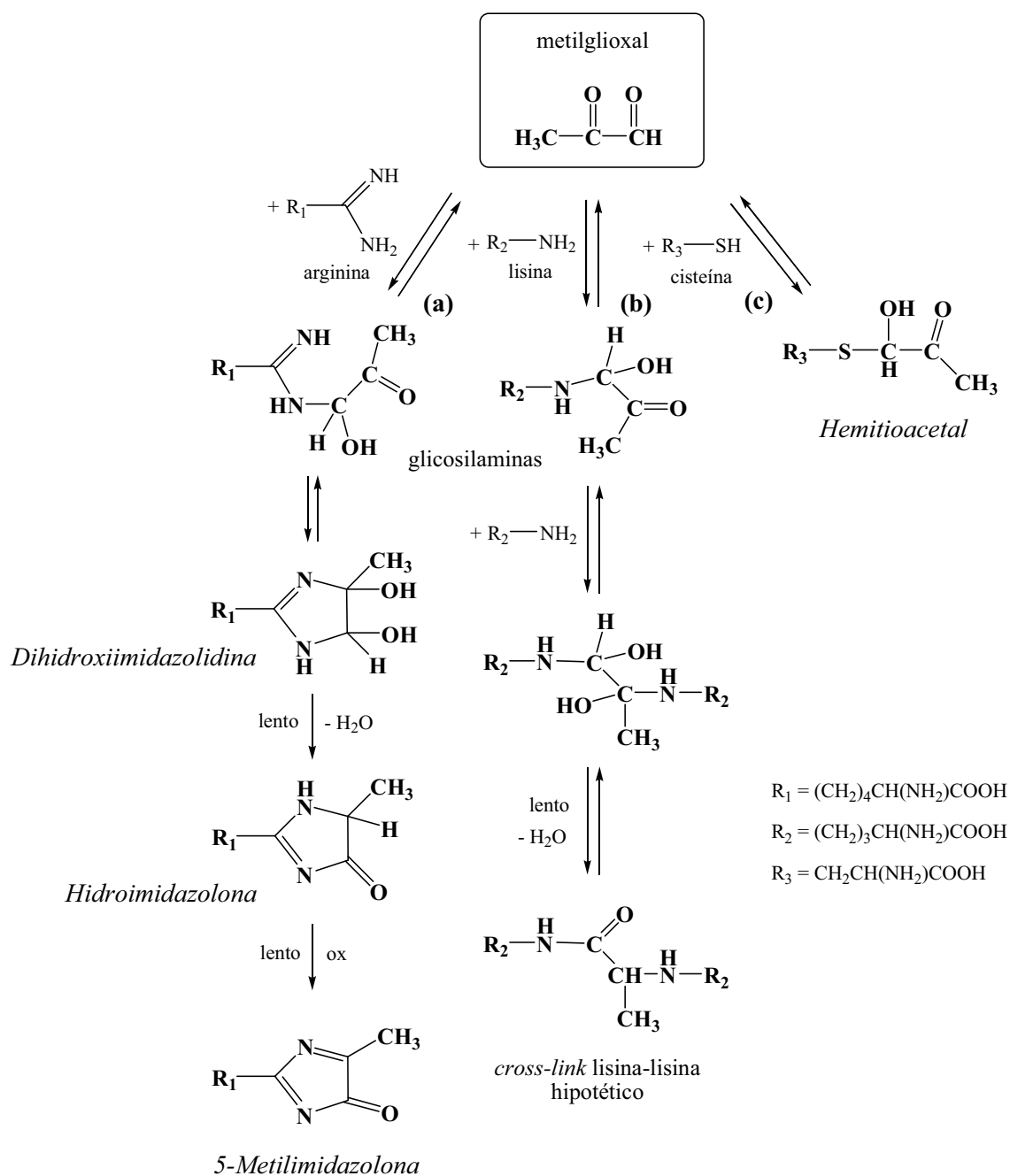


Figura 2.16. Mecanismo proposto para a reacção do metilglioxal com resíduos de arginina (a), lisina (b) e de cisteína (c) (Ref. 91).

2.3.1.6.2. MOLD e GOLD.

Brinkmann et al. [90], em 1995, numa curta publicação, enunciaram os aspectos de natureza estrutural de um dímero de lisina (MOLD, methylglyoxal-derived lysine dimer), formado na reacção modelo de uma lisina modificada, N_α -hippurillisina (N_α -benzoilglicillisina), com metilglioxal, em condições fisiológicas (Fig. 2.17). A reacção

de formação do dímero de lisina, i.e. um sal de 1,3-di- N_{α} -hippurillisino-4-metilimidazólio, envolve duas moléculas do aminoácido lisina modificado, com uma molécula de metilglioxal, com formação de uma diimina, a qual, por sua vez, reage com uma outra molécula de metilglioxal, em que uma molécula de ácido acético é eliminada na consequência de um rearranjo intramolecular do tipo Cannizzaro (Fig. 2.17) [90]. Subsequentemente, por ciclização e desidratação, surge a formação de um sal de imidazólio, de natureza estável (Fig. 2.17) [90]. De um modo semelhante, em 1995, Wells-Knecht et al. [89], enunciaram a identificação e caracterização de um sal de imidazólio (GOLD, glyoxal-derived lysine dimer), formado na reacção da mesma lisina modificada (N_{α} -hippurillisina), mas com glioxal. Os aspectos de natureza estrutural e reacção de formação, deste sal de imidazólio, derivado do glioxal, assemelham-se aos descritos anteriormente para o sal de imidazólio derivado do metilglioxal (Fig. 2.17). Estes dois estudos [89,90] fornecem, pela primeira vez, evidência para a possível formação de produtos *cross-link* entre proteínas, por modificação das proteínas nativas com derivados α -dicarbonílicos de baixa massa molecular.

No que respeita ao mecanismo de formação do AGE MOLD, Al-Abed et al. [166] propuseram um mecanismo reaccional distinto do referido anteriormente, acentuando-se as diferenças sobretudo no que respeita à ciclização e formação do anel imidazólio, o qual parece formar-se sem que haja formação do intermediário diimina (Fig. 2.18). A reforçar a proposta mecanística de Brinkmann et al. [90], Glomb e Monnier [57] observaram a formação de estruturas diimina, na modificação da albumina do soro bovino com glucose (Figs. 2.9 e 2.14). Yim et al. [156] enunciaram que na reacção de compostos dicarbonílicos com grupos amina ocorre a formação de intermediários radicalares, incluindo um catião radical dialquilamina e um anião radical dicarbonilo, que por sua vez reagem para formar produtos finais da glicação avançada. Embora os compostos GOLD e MOLD possam ser considerados como produtos finais da glicação avançada, relevantes nos estudos *in vitro*, onde concentrações de excesso de compostos dicarbonilo existem frequentemente, as baixas concentrações de glioxal e de metilglioxal nos sistemas biológicos sugerem que outros aldeídos reactivos, como o formaldeído, acetaldeído, glucose, e outros intermediários glicolíticos, contribuem como fonte de carbono para a reacção de ciclização, com vista à sua formação. Assim sendo, a formação de GOLD e de MOLD *in vivo* poderá ser mais complexa e difícil de deduzir, em comparação com as propostas mecanísticas existentes.

É de notar que o *cross-linking*, em proteínas, por sais de imidazólio pode ser intramolecular e intermolecular, mas este varia consoante a estrutura da proteína e a compactação da sua forma monomérica correspondente. A título de exemplo, a proteína ribonuclease (RNase) possui três resíduos de lisina [2,156,167], localizados no centro activo da proteína, ou pelo menos perto, os quais são locais preferenciais para a modificação da proteína pela glucose [168]. O facto destes resíduos de lisina se encontrarem proximamente localizados pode promover o *cross-linking* intramolecular na proteína. Em outras proteínas, a glicação também ocorre preferencialmente em sequências lisina-lisina [169], que favorecem o *cross-linking* intramolecular. Quando os resíduos de lisina, nas proteínas, se encontram dispostos em outras sequências de aminoácidos básicos [170,171], e quando se encontram próximos de resíduos de aminoácidos ácidos [171,172], o *cross-linking* intermolecular poderá então ser favorecido. Também as proteínas na superfície das membranas, que se apresentam mais densamente compactadas que as proteínas solúveis, são mais susceptíveis ao *cross-linking* intermolecular. Deste modo, depreende-se que a densidade de compactação das proteínas pode acelerar o seu envelhecimento, bem como o desenvolvimento do *cross-linking* intermolecular, agregação, e sua insolubilização, no decurso da reacção de Maillard.

Na década de noventa, Nagaraj et al. [173] identificaram a presença de MOLD no soro humano, bem como o aumento da sua detecção no soro de indivíduos com diabetes. Brinkmann-Frye et al. [174] quantificaram os *cross-links* GOLD e MOLD, presentes nas proteínas do cristalino, por recurso a LC-MS. Estes investigadores constataram que as concentrações se correlacionavam significativamente uma em relação à outra, e que estas aumentavam com o envelhecimento das proteínas do cristalino [174]. Além disso, observaram, também, que os níveis de GOLD e MOLD eram consideravelmente superiores, em comparação com os níveis dos *cross-links* fluorescentes pentosidina e ditirosina, pelo que se pode sugerir que os AGEs GOLD e MOLD constituem *cross-links* Maillard mais relevantes ao nível das proteínas do cristalino [174]. Ainda no mesmo estudo, estes *cross-links* foram detectados, embora para concentração baixas, no colagénio humano, mas a sua concentração aumentava com o envelhecimento do colagénio [174]. Ainda em relação aos *cross-links* de imidazólio, Odani et al. [175] constataram que os níveis de GOLD e de MOLD eram significativamente elevados nas proteínas do soro, em indivíduos urémicos. Todavia, os investigadores sugeriram que a origem do GOLD e do MOLD nas proteínas do soro, em

indivíduos urémicos, não era conhecida [175]. Além disso, uma vez que a concentração de glucose, neste estudo, não aumentou no soro em indivíduos urémicos, poderá deduzir-se que GOLD e MOLD não estão relacionados com a actividade fisiológica do açúcar [175].

Apesar da detecção de compostos imidazolona ter sido conseguida por recurso a métodos imunológicos, a detecção e a quantificação de determinados AGEs, como CML, CEL e os dímeros de lisina GOLD e MOLD, tem sido bem sucedida por recurso a técnicas cromatográficas (HPLC) e técnicas hífenadas, como a cromatografia gasosa e líquida, acopladas à espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS, respectivamente).

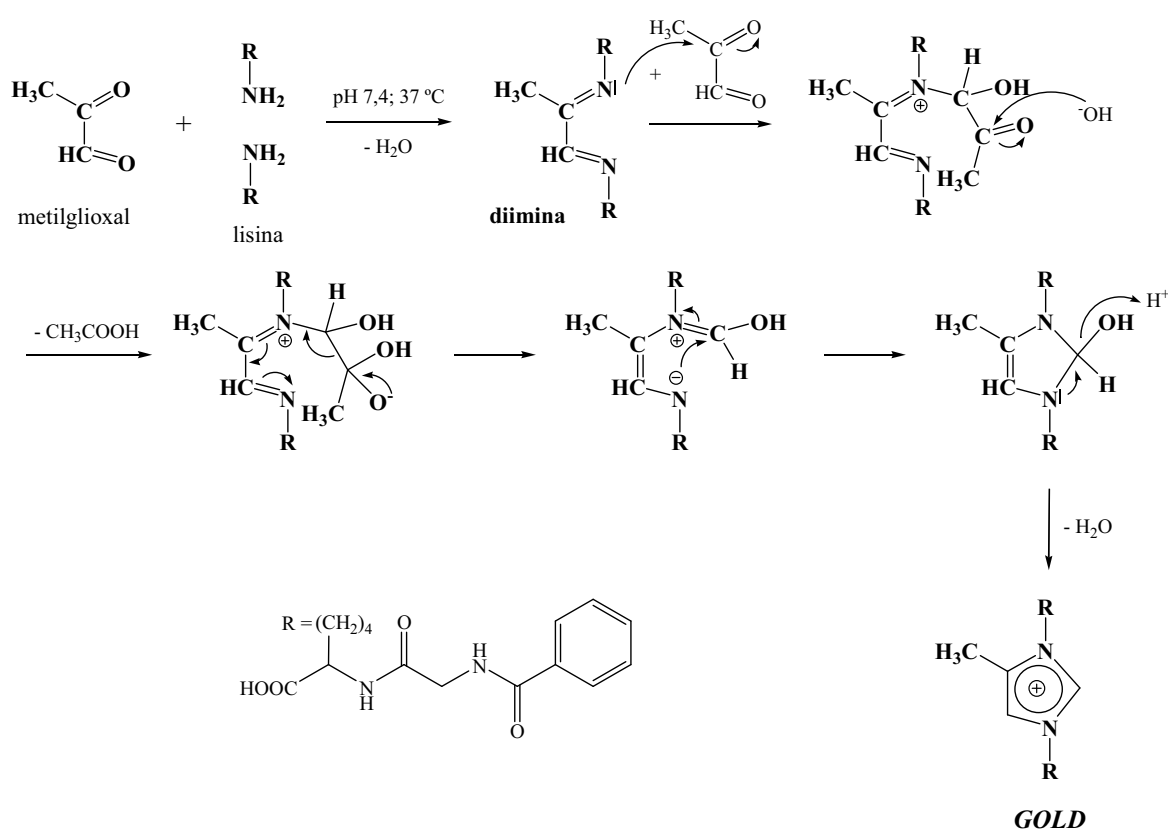


Figura 2.17. Mecanismo de reacção proposto para a formação do *cross-link* lisina-lisina GOLD, com o envolvimento do intermediário diimina (Ref. 90).

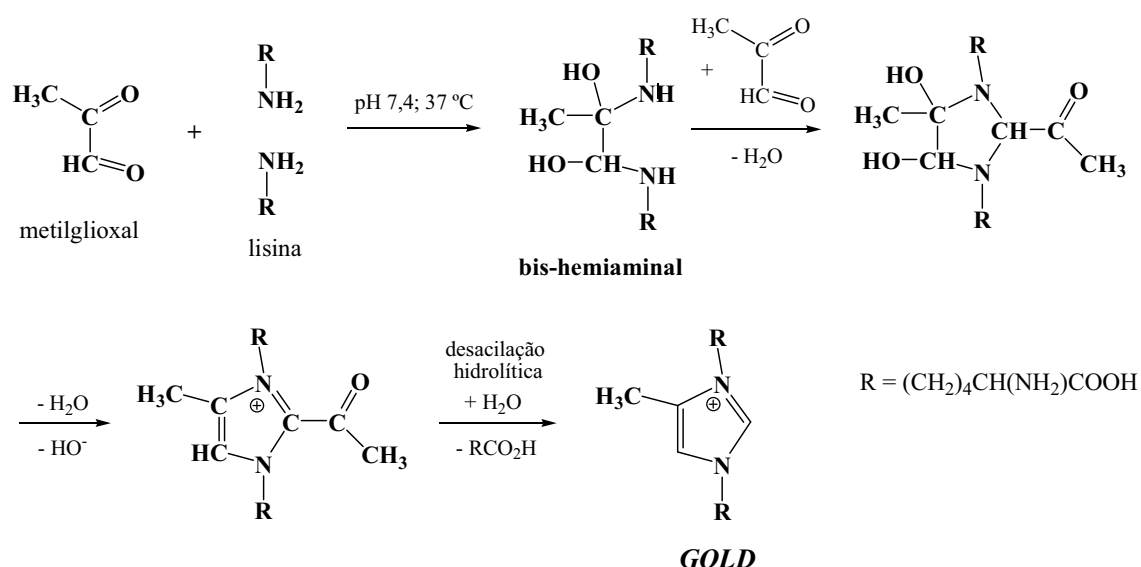


Figura 2.18. Mecanismo de reacção proposto para a formação do *cross-link* lisina-lisina GOLD, sem o envolvimento do intermediário diimina e por desacilação hidrolítica (Ref. 166).

2.3.1.6.3. Argpirimidina.

Com o conhecimento de que derivados dicarbonílicos de açúcares, como o glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglucosona, promovem o *cross-linking* de proteínas, com maior rapidez que a própria glucose, o interesse, no sentido de se obter uma informação mais detalhada sobre a reactividade dos compostos dicarbonílicos com os resíduos de amina livres nas proteínas, ou simplesmente, da reactividade destes dicarbonilos na base de compostos amina modelo, foi crescendo. Assim, em 1996, Al-Abed et al. [166], ao estudarem as reacções dos aminoácidos arginina e lisina modificados, N_α -CBZ-arginina e N_α -CBZ-lisina, respectivamente, com metilglioxal, observaram, no caso da arginina modificada, a formação de um composto fluorescente, com máximos de excitação e de emissão, no espectro de fluorescência, de $\lambda_{\text{máx}} = 320 \text{ nm}$ e de $\lambda_{\text{máx}} = 384 \text{ nm}$, respectivamente. Resultados da identificação e da caracterização do composto, levaram os investigadores a concluir que se tratava de um composto pirimidina, o qual fora designado por argpirimidina [166]. A natureza estrutural deste composto diferia da proposta estabelecida por Lo et al. [91], para a formação do composto fluorescente 5-metilimidazolona, na reacção de uma arginina modificada com metilglioxal. Na verdade, a estrutura de ressonância do anel de pirimidina formado, na estrutura do composto argpirimidina, é um bom indicador para a importante detecção de

fluorescência, nas misturas reaccionais de arginina modificada com o metilglioxal, em comparação com o anel de imidazolona insaturado, na estrutura do composto de 5-metilimidazolona. Os investigadores propuseram um mecanismo plausível para a formação do composto argpirimidina, envolvendo a forma monohidratada do dicarbonilo metilglioxal (Fig. 2.19) [166]. Assim, por reacção de dois átomos de azoto do grupo arginil, do aminoácido arginina modificado, com duas moléculas monohidratadas do dicarbonilo metilglioxal, tem-se a formação de um intermediário diimina, o qual, por condensação e por eliminação de uma molécula de ácido fórmico, conduz à formação do composto argpirimidina (Fig. 2.19) [166]. Com esta proposta mecanística, surge, pela primeira vez, a evidência notória para o envolvimento de formas hidratadas de dicarbonilos, i.e. dicarbonilos aldeídicos, na formação de produtos de reacção de Maillard, em condições fisiológicas (Fig. 2.19) [166]. Shipanova et al. [176] estudaram o efeito de agentes quelantes e de condições anaeróbias na formação do composto de argpirimidina, em que não se havia observado qualquer influência significativa na formação do composto, em comparação com a mesma reacção realizada, quer na ausência de agentes quelantes quer na presença de oxigénio. Estes resultados levaram os investigadores a sugerir que a formação do composto argpirimidina não envolve oxidação nem reacções catalizadas por metais [176]. Relativamente à proposta mecanística destes últimos investigadores para a formação da argpirimidina, a reacção envolve um intermediário reductona 3-hidroxipentano-2,4-diona, resultante da reacção de duas moléculas de metilglioxal, uma não-hidratada e outra monohidratada (Fig. 2.20) [176]. É de notar que a proposta mecanística de Shipanova et al. (Fig. 2.20) difere da proposta mecanística de Al-Abed et al. [166] (Fig. 2.19), para a formação do composto de argpirimidina. No segundo caso, em relação ao primeiro, não há formação de intermediário reductona, e ao que parece duas moléculas de metilglioxal reagem primeiramente com o grupo arginil, e só depois ocorre ciclização e eliminação de ácido fórmico, com formação do anel pirimidina (Fig. 2.19). Ainda no estudo de Shipanova et al. [176], fora observada a formação de argpirimidina, a partir de vários açúcares fisiológicos, verificando-se que os açúcares e ascorbato estudados revelavam ser precursores para a formação da argpirimidina. Contudo, a detecção da argpirimidina fora menor, em comparação com a correspondente detecção nas reacções do precursor dicarbonílico metilglioxal. Surpreendentemente, os açúcares glucose e frutose foram os precursores de açúcar que menos favoreceram a formação da argpirimidina [176]. Acresce ainda dizer que proteínas incubadas com o metilglioxal

apresentaram um espectro de fluorescência semelhante ao da argpirimidina, sugerindo a formação de produtos estruturalmente semelhantes à argpirimidina [176]. Uma vez que a concentração do metilglioxal se correlaciona com o grau de glicémia, a formação de produtos fluorescentes, derivados do metilglioxal, poderá ser relevante na diabetes *mellitus*, e nestes produtos insere-se, certamente, o composto argpirimidina. Nesta perspectiva, e tendo em consideração que os compostos α -dicarbonilo reagem prontamente com os resíduos de arginina nas proteínas, Padayatti et al. [177] (2001) tentaram identificar as modificações ocorridas nos resíduos de arginina, ao nível das proteínas do cristalino humano. Estes investigadores constataram, na base de métodos imunoquímicos, que os níveis de argpirimidina, nas proteínas do cristalino, são consideravelmente superiores aos de pentosidina [177]. Porém, os investigadores sugeriram que a importante detecção de argpirimidina não seria a causa para a ocorrência das significativas modificações estruturais nas proteínas do cristalino [177].

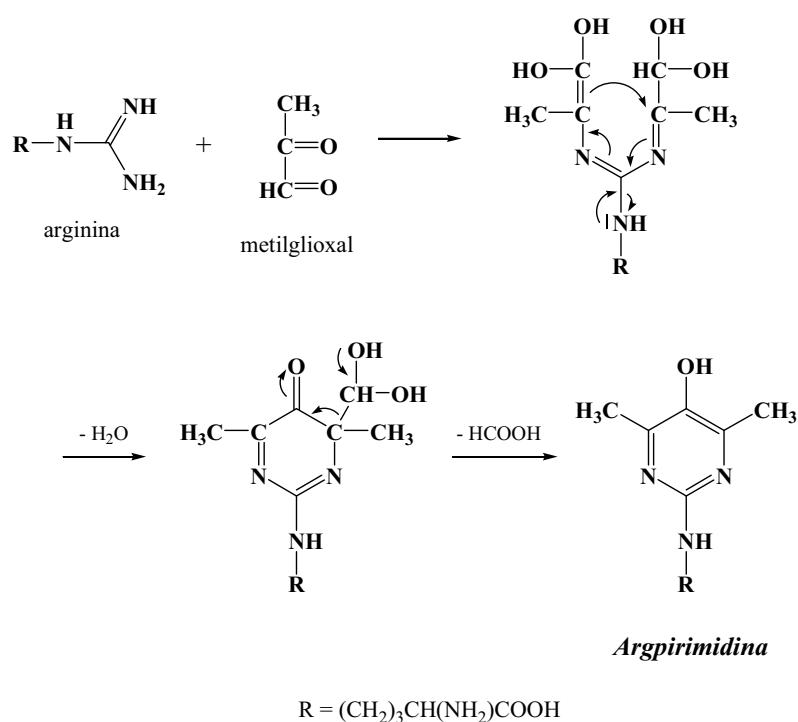


Figura 2.19. Mecanismo de reacção proposto para a formação de argpirimidina (Ref. 166).

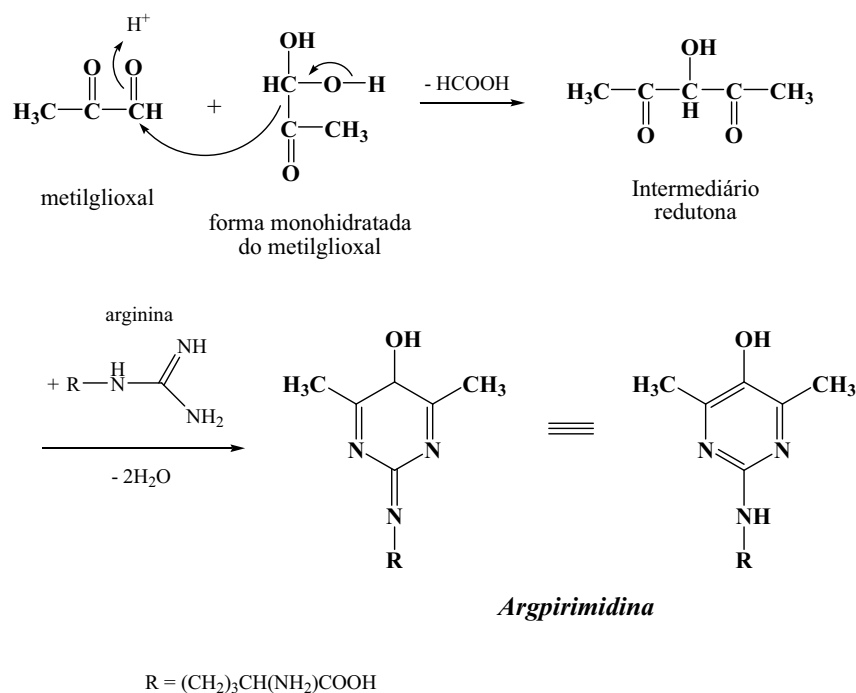


Figura 2.20. Mecanismo de reacção proposto para a formação de argpirimidina, via intermediário redutona (Ref. 176).

2.3.1.6.4. Tetrahidropirimidina (THP) e reinvestigação do composto 5-metilimidazolona.

Oya et al. [95] (1999) estudaram, também, a reacção de uma arginina modificada, a N_α -acetyl-L-lisina, com o metilglioxal. Os investigadores tentaram identificar o composto N_α -acetyl-5-metilimidazolona, proposto por Lo et al. [91], na referida reacção, por recurso a técnicas hifenadas, como LC-MS, no modo de monitorização de ião seleccionado (SIM, single ion monitoring), embora o pico correspondente ao referido produto não tivesse sido observado [95]. Tendo em consideração que a formação do composto 5-metilimidazolona parece, segundo Lo et al. [91], envolver a autooxidação espontânea do intermediário 5-hidro-5-metilimidazolona (hidroimidazolona) (Fig. 2.16a), Oya et al. [95] tentaram identificar o composto 5-metilimidazolona na incubação de 5-hidro-5-metilimidazolona, em condições fisiológicas, mas sem sucesso. Numa tentativa final, e no que respeita ao composto 5-metilimidazolona, os investigadores tentaram preparar 5-metilimidazolona, pelo método descrito por Lo et al. [91]. Contudo, a reacção conduziu à formação de um produto, com grande intensidade de fluorescência, idêntico cromatografica e espectrofotometricamente ao composto de

argpirimidina [95]. Relacionando os resultados, parece existir uma evidência clara de que o produto fluorescente, anteriormente identificado como 5-metilimidazolona, é, de facto, o composto argpirimidina. Ainda no estudo de Oya et al. [95], existiu evidência para a identificação de aductos não-fluorescentes, formados na reacção da arginina modificada com o metilglioxal, i.e. os compostos hidroimidazolona e tetrahidropirimidina. Este último composto representa um novo AGE, observado na reacção da arginina com o metilglioxal (Fig. 2.21). Na formação do composto de tetrahidropirimidina, estão envolvidos o grupo arginil do aminoácido arginina e duas moléculas de metilglioxal monohidratado (Fig. 2.21) [95]. Segundo os investigadores, no mecanismo da reacção de formação do composto tetrahidropirimidina, o grupo carbonilo da forma monohidratada do metilglioxal sofre ataque nucleofílico por parte do grupo arginil, originando a formação de uma base de Schiff, após desidratação (Fig. 2.21) [95]. Subsequentemente, uma outra molécula monohidratada de metilglioxal sofre, também, ataque nucleofílico por parte do grupo amina primário do intermediário de base Schiff, anteriormente formado (Fig. 2.21) [95]. O mecanismo da reacção é finalizado por desidratação e por condensação aldólica, com formação do anel de pirimidina saturado (Fig. 2.21) [95]. Apesar desta descrição corresponder a uma proposta mecanística dos autores para a formação do composto tetrahidropirimidina, a hipótese de que um dímero de metilglioxal, possuindo grupos aldeído livres, reage com o grupo arginil, para formação do produto condensado tetrahidropirimidina, não pode ser ignorada [95].

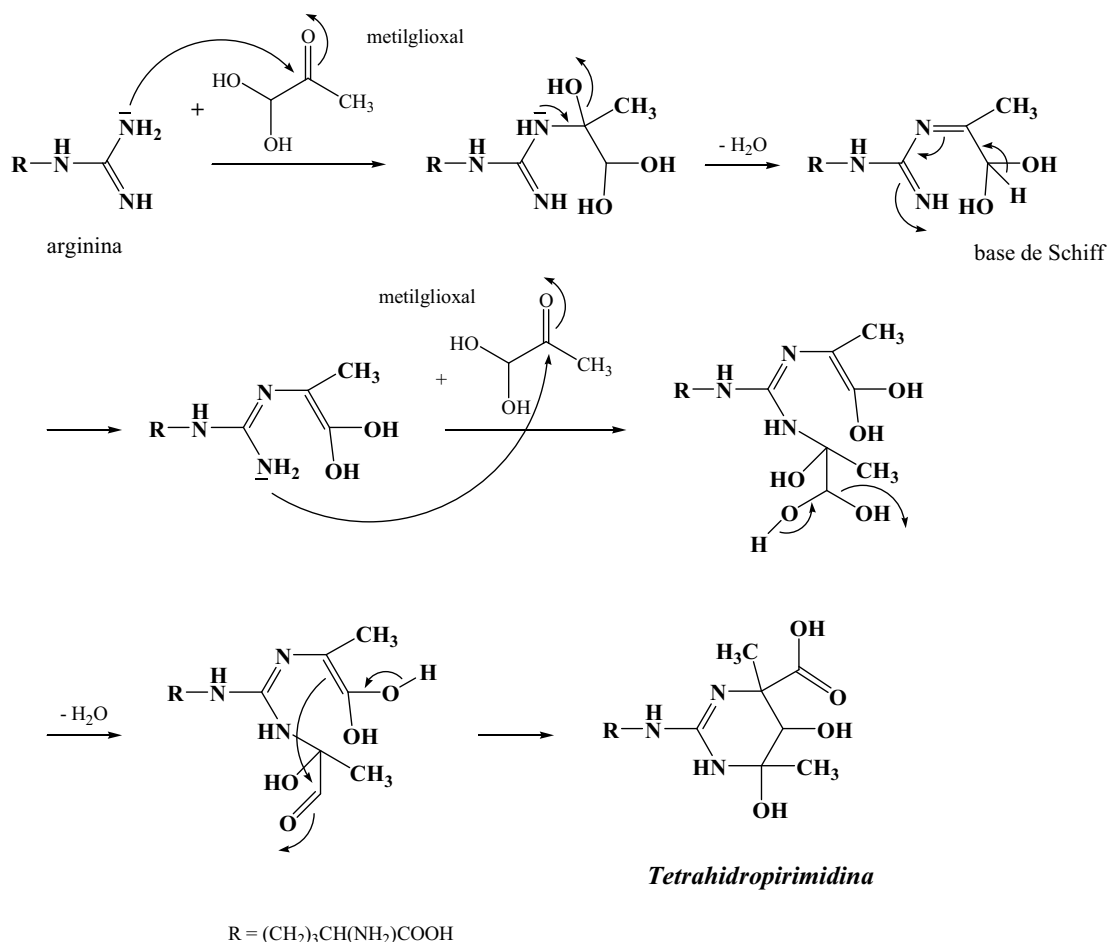


Figura 2.21. Mecanismo de reacção proposto para a formação de tetrahidropirimidina (Ref. 95).

2.3.1.6.5. Reinvestigação de AGEs: α NFC-1, β NFC-1 e γ NFC-1.

O AGE pentosidina [88], abordado anteriormente, é bem conhecido, e foi primeiramente identificado no colagénio de tecidos humanos, contudo as pequenas quantidades observadas para este AGE nos tecidos não justificam as variações das propriedades físicas do colagénio, sobretudo no que respeita às modificações desta proteína com o envelhecimento. No que respeita à modificação do colagénio, Bailey et al. [123] identificaram uma série de compostos fluorescentes, em adição à detecção do composto pentosidina. Estes últimos investigadores identificaram, também na modificação do colagénio com ribose ou glucose, um composto não-fluorescente (NFC) [123], como anteriormente mencionado. Apesar de no estudo de Bailey et al. [123] o pico cromatográfico NFC-1 corresponder, inicialmente, a um único composto, posteriormente, num estudo de continuação, de Paul et al. [178], verificou-se que, na verdade, o pico NFC-1, na incubação do colagénio com a ribose, em particular, constitui

uma mistura complexa de AGEs de elevada e baixa massa molecular. Dois compostos de baixa massa molecular foram caracterizados, neste estudo, os compostos α NFC-1 e β NFC-1, com massa moleculares de 229 e 215 Da, respectivamente (Fig. 2.22) [178]. Um terceiro componente, γ NFC-1, que não pudera ser isolado, pelo menos em quantidades suficientes que permitissem a sua caracterização estrutural. No entanto, por cromatografia por filtração em gel, os autores constataram que este componente constitui uma mistura de compostos do tipo NFC-1, em que pelo menos um dos compostos tem maior massa molecular que os compostos α NFC-1 e β NFC-1 identificados [178]. Os investigadores sugeriram que α NFC-1 (Fig. 2.22) possa ser formado na reacção da arginina com o glioal [178]. Foram propostas duas estruturas possíveis para o composto α NFC-1 (Fig. 2.22) [178]. A última estrutura α NFC-1 (Fig. 2.22) fora originalmente proposta por Schwarzenbolz et al. [179], com base na análise NMR do composto Glarg. Em relação a β NFC-1 (Fig. 2.22), os investigadores sugeriram que o composto possa ser formado na reacção da arginina com o metilglioal [178]. Tendo em consideração os aspectos estruturais deste derivado metílico de imidazolona, três formas tautoméricas foram propostas (Fig. 2.22) [178]. A imidazolona proposta é estruturalmente idêntica à identificada, por Lo et al. [91], na reacção da arginina modificada, N_{α} -acetil-L-arginina, com o metilglioal (Fig. 2.16). De referir ainda que Henle et al. [180] isolaram um composto, também estruturalmente idêntico à última referida imidazolona, a partir de congêneres alimentares. Ainda no estudo de Paul et al. [178], verificou-se que as hidroimidazonas identificadas são lábeis nas condições utilizadas na hidrólise ácida. Konishi et al. [181] identificaram e caracterizaram, ao nível da análise de hidrolisados de tecidos glicosados *in vitro*, compostos imidazolona, resultantes da reacção da arginina com o derivado de açúcar 3-deoxiglucosona.

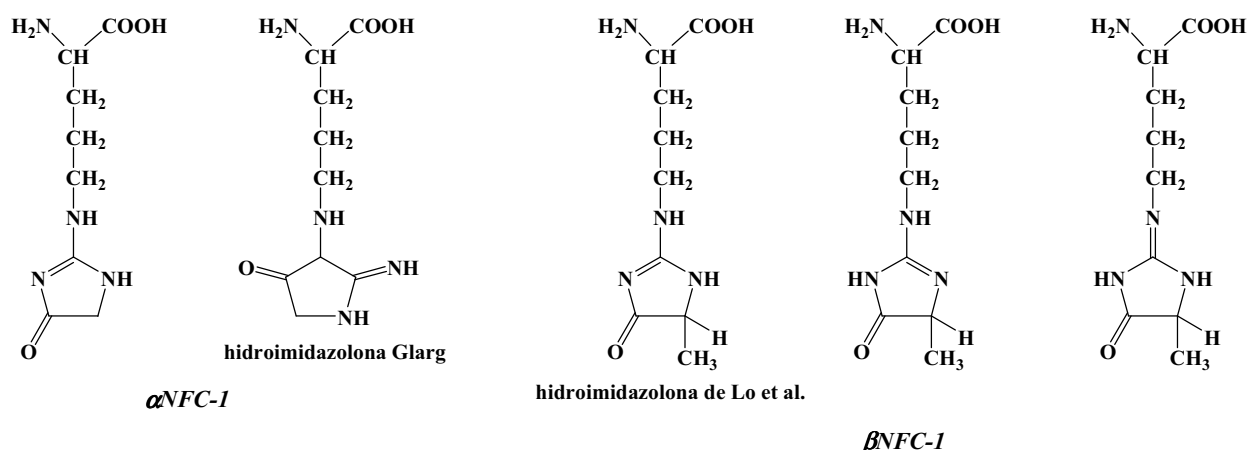


Figura 2.22. Estruturas químicas dos compostos αNFC-1 e de βNFC-1 (Ref. 178).

2.3.1.6.6. CMA.

Iijima et al. [182] identificaram um novo composto, lábil em condições ácidas, a partir do colagénio glicado *in vitro*, o composto de *N*_ω-carboximetilarginina (CMA) (Fig. 2.23), numa proporção de, aproximadamente, 100 vezes superior à do AGE pentosidina [88]. A reacção de formação de CMA não é clara, segundo os investigadores, apesar de poder existir o envolvimento de espécies dicarbonilo na sua formação, como tem sido observado na formação dos AGEs CML, CEL, hidroimidazolonas, *cross-links* de imidazólio, entre outros [182]. Odani et al. [183] demonstraram, pela primeira vez, evidência para a formação do AGE CMA *in vivo*, constatando, também, que, em comparação com os resultados do controlo, os níveis de CMA eram significativamente elevados nas proteínas do soro de indivíduos diabéticos [183].

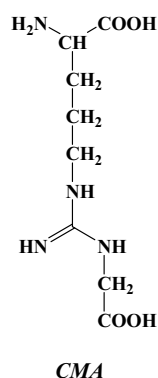


Figura 2.23. Estrutura química do composto CMA.

2.3.1.6.7. Reinvestigação de AGEs: Dihidroxiimidazolidina, hidroimidazolona e CMA, derivados para o glioxal.

Dada a crescente importância do envolvimento de formas dicarbonílicas simples, como o glioxal e metilglioxal, na glicação, e tendo em conta as modificações que estas formas inferem ao nível dos compostos amina, tem existido uma necessidade de melhor se compreender os processos reactivos envolvidos, para além de clarificar alguns resultados contraditórios existentes na literatura. Assim, Glomb e Lang [92], em 2001, numa tentativa de clarificação dos compostos formados, ao nível da reacção da arginina com o glioxal, procederam a uma reinvestigação do processo reaccional, com isolamento e caracterização das espécies envolvidas. Na reacção da arginina modificada, N_{α} -*t*-BOC-arginina, com o glioxal, os investigadores constataram que o composto de dihidroxiimidazolidina constitui o produto maioritário na reacção, e não apenas em condições fisiológicas, mas também para uma gama de temperaturas de 20 – 50 °C, e na gama de pH de 4 – 8 [92]. Os autores observaram que o produto maioritário sofre degradação, em pequena extensão, para formar o composto CMA (Fig. 2.24) [92]. Ainda no estudo de Glomb e Lang, não fora reportada a formação do composto hidroimidazolona [92]. Porém, em condições ácidas, os investigadores notaram que as formas dihidroxiimidazolidina e CMA se convertem completamente em hidroimidazolona [92]. Este resultado explica o obtido por Schwarzenbolz et al. [179], na medida em que estes últimos autores utilizaram condições fortemente ácidas para a remoção do grupo acetil do aducto N_{α} -acetil-arginina-glioxal detectado, na incubação da arginina modificada com o glioxal. A detecção de hidroimidazolona, na incubação do colagénio com a ribose, em condições fisiológicas, no estudo de Paul et al. [178], deve-se, segundo Glomb e Lang [92], ao tratamento ácido realizado nas amostras de proteína modificada, e, assim, o composto detectado corresponde puramente a um artefacto. Numa cronologia anterior à importância de compostos dicarbonilo, e até mesmo, em parte, ao fenómeno de glicação, Glass e Pelzig [184] (1978) estudaram a modificação dos resíduos de arginina com o glioxal, na presença de um tampão borato a pH 8 – 9. Na presença do tampão, os investigadores observaram um único produto, embora, na ausência de tampão, tivesse sido observada uma mistura de produtos [184]. Na medida em que foi possível regenerar arginina, a partir de um produto de reacção complexado com o tampão, conclui-se que o produto de reacção seria N^7 , N^8 -(1,2-dihidroetil-1,2-il)-arginina ou dihidroxiimidazolidina [184]. Numa data próximo do estudo anterior, Takahashi [185] (1977) identificara a formação de um produto instável, na mistura

reaccional da arginina com glicoxal, que corresponde certamente ao composto hidroimidazolona, o qual, a $\text{pH} > 7$ parece degradar-se com formação de arginina e de outros produtos de reacção. Todavia, as estruturas moleculares destes produtos não foram caracterizadas, neste estudo. Dihidroxiimidazolidinas são estruturalmente agregados dihemiaminal, relativamente estáveis à subsequente eliminação de água, que normalmente ocorre quando da reacção de compostos amina com compostos contendo grupos carbonilo (Fig. 2.24). Têm sido identificados compostos análogos à dihidroxiimidazolidina, derivada para o glicoxal, nomeadamente os compostos 2-imino-4,5-dihidroxiimidazolidina, na reacção da guanidina, metil/alquilguanidina, e *N*-benzil-2-guanidino acetamida com o glicoxal, em solução aquosa a $\text{pH} 8$ [186,187]. Teoricamente, todas as reacções da arginina, e derivados, com compostos α -dicarbonilo, procedem inicialmente com a formação de dihidroxiimidazolidinas. Todavia, o único composto reportado, como sendo estruturalmente semelhante à dihidroxiimidazolidina, derivada para o glicoxal, e a constituir-se como o único produto na reacção, constitui um derivado do α -dicarbonilo 1,2-ciclohexanodiona [188]. Na verdade, à semelhança do dicarbonilo glicoxal, 1,2-ciclohexanodiona constitui um dicarbonilo simétrico, designação adoptada para moléculas dicarbonilo com dois centros electrofílicos de energética semelhante. Nas reacções com outros compostos dicarbonílicos, apenas tem sido observada a formação de hidroimidazolonas. Ainda no estudo de Glomb e Lang [92], os autores propuseram dois mecanismos teóricos para a formação do composto CMA a partir de dihidroxiimidazolidina, mas apenas um dos mecanismos se mostrou satisfatório interpretar a formação do AGE (Fig. 2.24). No mecanismo viável, por abertura do anel imidazolidina, com formação de uma estrutura semelhante à forma de hemiaminal inicial, e por disproporção intramolecular, tem-se a formação de CMA (Fig. 2.24) [92]. Este mecanismo é análogo ao proposto para a formação de CML, no que respeita à clivagem oxidativa em C-2 da cadeia do açúcar da base de Schiff formada, na reacção do composto amina com açúcar (Figs. 2.9 e 2.14) [57]. O mecanismo proposto é, igualmente, suportado pela correlação existente para o aumento da formação de CMA para valores de pH elevados, os quais promovem o processo de abertura do anel de imidazolidina formado (Fig. 2.24) [92].

Relativamente à reactividade do dicarbonilo glicoxal *in vitro*, Cotham et al. [189] demonstraram que dihidroxiimidazolidina é o produto maioritário, observado na reacção do glicoxal com ribonuclease, em condições fisiológicas. Os investigadores concluíram ainda que os agregados de dihidroxiimidazolidina e de hidroimidazolona são formados

ao nível de resíduos de arginina específicos no enzima [189]. Além disso, verificou-se igualmente que dihidroxiimidazolidina e hidroimidazolona não são formados em quantidades relevantes, na incubação da glucose com ribonuclease [189]. Este resultado suporta o facto de que formação de glioxal não constitui uma via reaccional importante para a formação de CML, pelo menos nas incubações com ribonuclease [189]. O facto de existirem resíduos de arginina específicos, na proteína, para a reacção com o glioxal, indica favoravelmente uma especificidade da reactividade da proteína com formas dicarbonilo, o que explica o facto de formas dicarbonilo se constituírem como espécies reactivas reconhecidas ao nível dos processos fisiológicos.

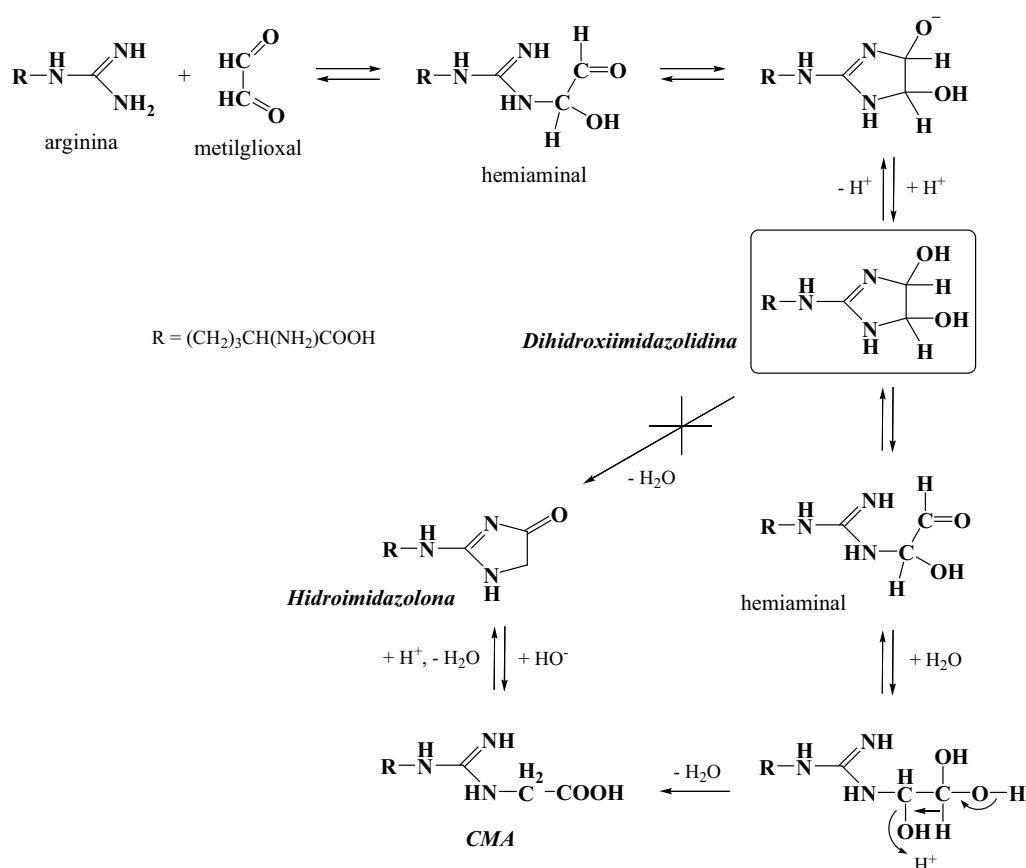


Figura 2.24. Mecanismo proposto para a reacção da arginina com glioxal. Vias reaccionais envolvidas na formação de CMA a partir de dihidroxiimidazolidina (Ref. 92).

2.3.1.6.8. Triosidinas.

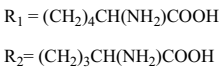
Embora a reactividade dos resíduos de aminoácidos básicos com hexoses, pentoses, treoses e oxoaldeídos esteja consideravelmente compreendida, sobretudo no

que respeita a formação de estruturas AGEs, menos atenção tem sido dada à reactividade de derivados de triose, como o gliceraldeído. É do conhecimento de que a reactividade do açúcar é proporcional à quantidade de açúcar disposto na forma de cadeia aberta, i.e. é inversamente proporcional ao comprimento da cadeia carbonada do açúcar [190]. Deste modo, a reactividade do gliceraldeído deverá ser superior à das formas açúcar nativas, hexose e pentose. O gliceraldeído é considerado um importante intermediário no metabolismo da fructose [191]. Além disso, é um importante agente para o *cross-linking* nas proteínas, e é também um precursor na formação da argpirimidina [166] e pentosidina [88]. A forma fosforilada do gliceraldeído constitui-se um intermediário na formação de CML e CEL [130]. Com o intuito de melhorar a compreensão da reactividade de formas triose, Tessier et al. [192] estudaram a reacção do gliceraldeído com compostos lisina e arginina modificados, em condições fisiológicas. Segundo os investigadores, quatro produtos da reacção de Maillard foram identificados (Fig. 2.25) [192]. Arg-hidroxi-triosidina e lis-hidroxi-triosidina correspondem aos produtos fluorescentes detectados, representando o primeiro um *cross-link* arginina-lisina e o segundo um *cross-link* lisina-lisina (Fig. 2.25; produtos B e C, respectivamente). Os dois produtos restantes e não-fluorescentes, são aductos lisil, trihidroxi-triosidina e triosidina-carbaldeído (Fig. 2.25; produtos A e D, respectivamente). Ainda no mesmo estudo, estes investigadores propuseram um mecanismo reaccional para a formação dos quatro produtos identificados (Fig. 2.25) [192]. Resumidamente, o complexo mecanismo reaccional proposto inicia-se com a condensação de uma molécula de gliceraldeído com uma outra de lisina, com formação do produto Amadori, o qual pode conduzir à formação de um *cross-link* directo por formação de uma base de Schiff, ao nível do segundo resíduo de aminoácido reagido (Fig. 2.25) [192]. Todavia, não se verificara que a formação deste simples *cross-link* (não fluorescente) era hidroliticamente estável [192]. Assim sendo, o produto Amadori inicial reage com uma segunda molécula de gliceraldeído, para formar um novo centro Amadori, i.e. o produto bis-Amadori (Fig. 2.25) [192]. Este composto constitui o intermediário comum para todas as estruturas propostas por Tessier et al. (Fig. 2.25). Subsequentemente, por condensação aldólica intramolecular, seguida por uma série de desidratações e tautomerizações (ceto-enol e rearranjo Amadori), obtem-se a formação do produto trihidroxi-carbaldeído (Fig. 2.25 – produto D). Por oxidação do tautómero 1,2-dihidropiridina, tem-se a formação de trihidroxi-triosidina (Fig. 2.25 – produto A). Por outro lado, tautomerização ceto-enol do produto bis-Amadori, seguida por reacção

com um resíduo de arginina ou um segundo de lisina, e por ciclização, subsequentes desidratações e tautomerizações, conduzem à formação das estruturas *cross-link* lis-hidroxi-triosidina e arg-hidroxi-triosidina (Fig. 2.25 – produto B e C, respectivamente). A última estrutura requer, para a sua formação, a oxidação do intermediário 1,2-dihidropiridina (Fig. 2.25 – produto C). Os investigadores, verificaram que, quando da incubação de açúcares e de α -oxoaldeídos com os mesmos compostos amina, as quatro triosidinas identificadas revelaram ser específicas da reactividade do gliceraldeído e da dihidroxiacetona [192]. O gliceraldeído-3-fosfato, um intermediário glicolítico, é também precursor da arg-hidroxi-triosidina e da triosidina-carbaldeído [192]. Apesar de Chellan e Nagaraj [102] estabelecerem um mecanismo para a formação do composto pentosidina (incubação da ribose com o colagénio), em que se encontra envolvido o composto gliceraldeído (Fig. 2.7b), Tessier et al. [192] não detectaram a formação do composto pentosidina nas misturas reaccionais de gliceraldeído estudadas. Relativamente ao composto argpirimidina, formado na reacção da arginina com metilglioxal [166], Tessier et al. [192] constataram que este pode ser sintetizado a partir do gliceraldeído, gliceraldeído-3-fosfato e a partir da dihidroxiacetona. A formação *in vitro* da argpirimidina a partir do gliceraldeído fora anteriormente observada por Ohmori et al. [193], possivelmente dada a degradação não-enzimática do gliceraldeído em metilglioxal, e por Taguchi et al. [194], dada uma possível contaminação pelo metilglioxal de soluções comerciais de gliceraldeído. Todavia, Tessier et al. não detectaram metilglioxal nas soluções de gliceraldeído usadas, embora o envolvimento de processos autoxidativos haja sido proposto por estes últimos investigadores, no que respeita à formação dos compostos triosidina identificados [192]. Estes autores tentaram incubar proteínas da cornea suína com gliceraldeído, no sentido de averiguar se a possível formação dos compostos triosidina, identificados ao nível de reacções modelo. Porém, e após a hidrólise ácida, apenas algumas triosidinas estáveis, nas condições de meio estudadas, foram identificadas, como a arg-hidroxi-triosidina e a lis-hidroxi-triosidina, para além da detecção da argpirimidina [192]. Por meio da análise por HPLC, verificou-se, ainda no mesmo estudo, que a argpirimidina parece representar a modificação mais importante nos aminoácidos reagidos [192].

A semelhança em termos de reactividade, entre trioses e açúcares, pode favoravelmente ajudar a clarificar determinados detalhes dos complexos processos reaccionais dos açúcares, sobretudo quando trioses estão envolvidas neste tipo de processos. A importância da sequência reactiva: açúcares, trioses e α -oxoaldeídos, ao

nível dos processos reactivos Maillard, parece indicar uma tendência para a dissecação da reactividade das formas dicarbonilo e da sua funcionalidade, na interpretação dos processos de glicação. Assim, talvez uma abordagem mais pormenorizada da funcionalidade das formas dos α -oxoaldeídos seja um passo ainda a percorrer no contexto da glicação.



80

2.3.1.6.9. Dihidropiridina.

A formação de derivados de dihidropiridina foi observada ao nível da reacção de compostos amina com gliceraldeído (Fig. 2.25) [192]. No mecanismo de formação de derivados de triosidina, verificou-se que derivados de dihidropiridina podem sofrer oxidação, embora a abertura do anel de piridina não tenha sido proposta [192], em comparação com o observado para a abertura do anel de pirazina no mecanismo proposto para a formação do AGE CML (Fig. 2.9) [57]. Slatter et al. [195] (1998) reportaram a formação de um derivado de dihidropiridina (NLMDD/NPMDD), na reacção do malondialdeído (Fig. 2.26) com a lisina modificada, N_α -carbобензоxilina, e propilamina. O malondialdeído trata-se de uma espécie dicarbonílica reactiva, sendo conhecido como o produto maioritário resultante da clivagem oxidativa de ácidos gordos poliinsaturados (PUFAs) [196], e por isso responsável pela formação de vários produtos oxidados, encontrados ao nível da lipoproteína de baixa densidade (LDL, **l**ow **d**ensity **l**ipoprotein). Níveis elevados de malondialdeído e de colagénio glicado, i.e. manifestações da diabetes de longo-termo, revelam-se responsáveis pela aceleração da oxidação da lipoproteína LDL *in vitro*. Ainda no estudo de Slatter et al. [195], observou-se a formação de imidopropeno (Fig. 2.26), na mesma reacção modelo, embora numa quantidade baixa. A formação de imidopropeno não é esperada ser estável, para um tempo reaccional longo, na medida que a formação deste *cross-link* é completamente reversível na presença de água (formação do composto imina), e, por isso, não é esperado que esta forma constitua um *cross-link* eficiente em proteínas de longa vida. A formação de derivados de imidopropeno foi anteriormente proposta, no mecanismo de formação do composto CML (Fig. 2.9) [57]. O composto NPMDD, ou o seu equivalente ao nível da modificação das proteínas (Fig. 2.26), NLMDD (resíduos **l**isina), é estável e pode formar vários *cross-links* com moléculas de propilamina, i.e. *cross-links* envolvendo 2/3 moléculas de propilamina (Fig. 2.27) [195]. Os autores propuseram dois mecanismos para a formação de NPMDD [195]. Todavia, a formação de NLMDD deverá apenas acontecer de forma vestigial *in vivo*, devido às inúmeras espécies reactivas nos sistemas fisiológicos que poderiam reagir com os intermediários envolvidos, no mecanismo proposto para a formação de NLMDD.

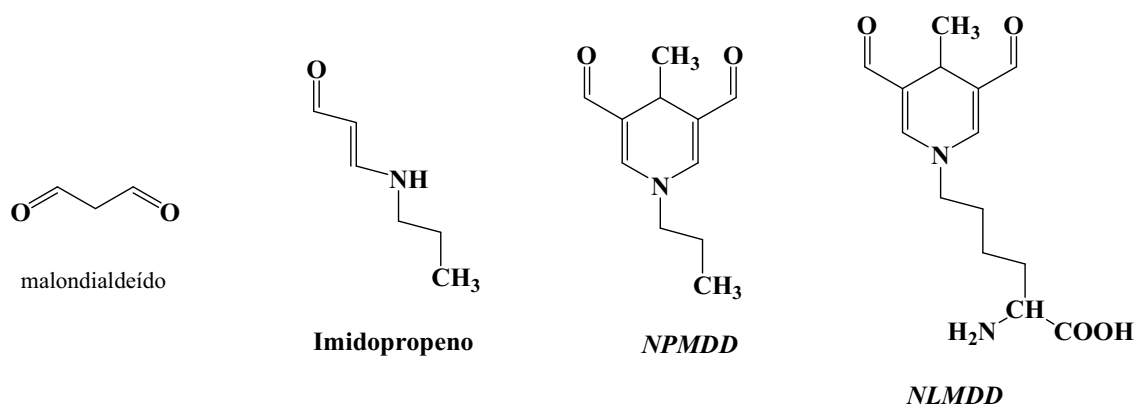


Figura 2.26. Estruturas químicas do malondialdeído, e dos *cross-links* imidopropeno, NPMDD (derivado da propilamina) e NLMDD (derivado da lisina).

2.3.1.6.10. Outros *cross-links*. Relevância do produto Amadori no *cross-linking*.

À semelhança das estruturas *cross-link* referidas anteriormente (Figs. 2.12 e 2.13), para os compostos glucosepano, pentosinano, pentosidina, DOGDIC e DOPDIC [75–77], têm sido envidados esforços para a elucidação da reacção de formação de unidades *cross-link*, derivadas para fragmentos de açúcar, como para os compostos α -dicarbonilo. É de notar que na literatura uma boa parte das estruturas AGE propostas, do tipo *cross-linking*, têm na sua formação o envolvimento de formas açúcar de menor massa molecular. É sabido, ao nível da literatura, que a detecção de pequenas quantidades de *cross-links*, e.g. pentosidina e dímeros de lisina derivados para o glicoxal e metilglicoxal GOLD e MOLD, não é satisfatória para interpretação da grande extensão de *cross-linking* que, por vezes, se observa em determinados tecidos. Nesta perspectiva, Lederer et al. [141], monitorizaram as reacções da butilamina e da creatina ou de N_α -acetil-L-arginina, com o metilglicoxal, segundo condições próximas das condições fisiológicas (temperatura de 40 °C; pH 7.4), observando, em ambas as reacções um produto maioritário de hidroimidazolona imina (um derivado de hidroimidazolona), em que o grupo carbonilo se encontra reagido, com a formação de uma imina. Lederer et al. [141] propuseram um mecanismo para a formação destes derivados de hidroimidazolona. Assim, tem-se inicialmente a reacção da butilamina com metilglicoxal, com formação da esperada aldimina. Posteriormente, a forma derivada da guanidina reage com a referida aldimina, com formação de um composto análogo à conhecida forma dihidroxiimidazolidina [141]. Por desidratação, tem-se a formação da

forma hidroimidazolona imina. Usando glucose, em vez de metilglioxal, os investigadores identificaram dois produtos, em cada uma das reacções mencionadas acima para o metilglioxal, i.e. na reacção com creatina e com N_α -acetil-L-lisina [75,141]. Estes dois últimos produtos identificados constituem formas diastereoisómericas de um composto denominado por glucosepano, formado por um mecanismo reaccional semelhante ao descrito para os derivados de hidroimidazolona imina [141] (ver secção 2.3.1.5.6) . Num estudo posterior, Lederer e Klaiber [197] incubaram os aminoácidos modificados N_α -*t*-BOC-L-lisina e N_α -*t*-BOC-L-arginina com glioxal, e também com metilglioxal, segundo condições também próximas das condições fisiológicas (temperatura de 40 °C; pH 7.4). A referidas reacções foram monitorizadas, observando-se a formação inicial da forma aldimina, por reacção da lisina modificada com o grupo aldeídico dos dicarbonilos glioxal e metilglioxal (Fig. 2.28) [197]. Estas formas aldimina ao reagirem com a arginina modificada originam a formação de compostos derivados de dihidroxiimidazolidina, os quais sofrem desidratação, para a formação de formas derivadas da hidroimidazolona (Fig. 2.27) [197]. Estes compostos (Fig. 2.27) assemelham-se estruturalmente aos derivados de hidroimidazolona imina, identificados na reacção da butilamina e da creatina ou arginina modificada com metilglioxal [141]. As formas derivadas da hidroimidazolona imina, observadas na reacção da lisina e da arginina modificadas com glioxal e metilglioxal, foram designadas como GODIC e MODIC, respectivamente (Fig. 2.27) [197]. É de notar que a formação de hidroimidazolona iminas, derivadas para os substratos de açúcar (hexose e pentose), fora anteriormente abordada, neste capítulo (ver secção 2.2.1.5.6), ao nível do mecanismo reaccional envolvido na formação de glucosepano e de pentosidina [75–77]. Todavia, verificou-se que estes derivados não poderiam estar relacionados com a formação dos *cross-links* glucosepano e pentosidina (Figs. 2.12 e 2.13) [76,77]. A detecção de GODIC e de MODIC fora também observada ao nível da modificação da proteína do soro bovino (BSA) com glioxal, metilglioxal e D-glucose [197]. Ainda no mesmo estudo, os investigadores observaram que a formação de GODIC e MODIC fora favorecida para concentrações baixas de α -dicarbonilos, relativamente à formação dos *cross-links* GOLD e MOLD [197]. Este resultado sugeriu, que, atendendo aos níveis fisiológicos extremamente baixos do glioxal e do metilglioxal, o significado fisiológico dos *cross-links* GODIC e MODIC poderá ser superior à dos *cross-links* GOLD e MOLD [197]. É de referir que o composto DODIC constitui um derivado de hidroimidazolona imina, à semelhança dos compostos GODIC

e MODIC, identificado contido na reacção de lisina e de arginina modificadas com 3-deoxiglucosona [198].

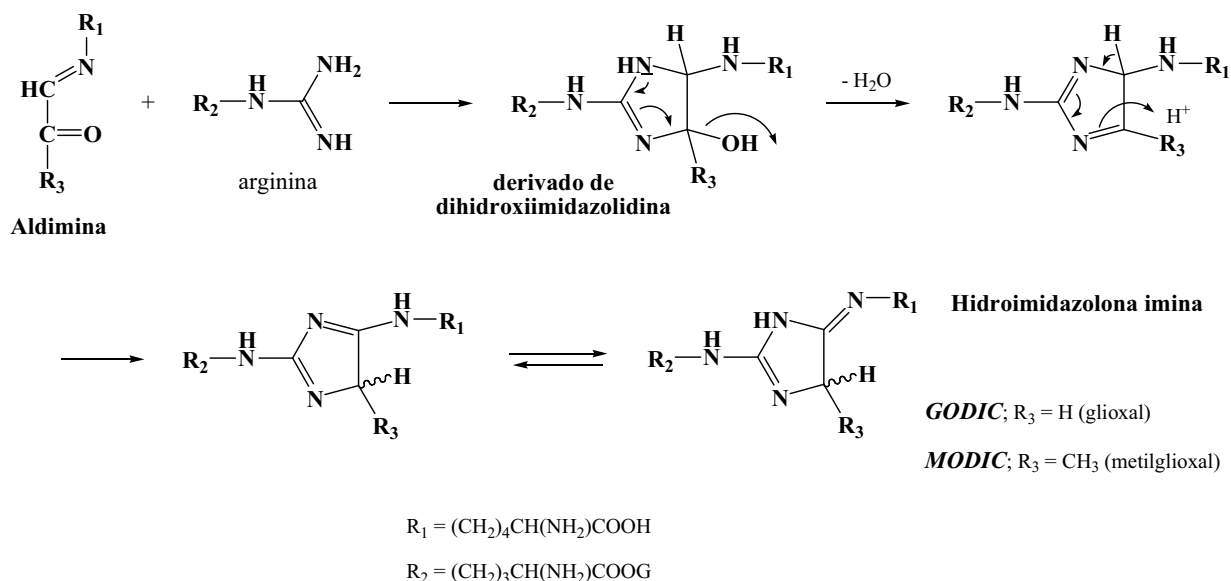


Figura 2.27. Mecanismo de reacção proposto para a formação dos *cross-links* GODIC e MODIC, para a reacção de lisina e de arginina modificadas com glioxal e metilglioxal, respectivamente (Ref. 197).

2.3.2. Controlo e inibição da reacção de Maillard *in vivo*.

Em conformidade com os aspectos bem revistos na literatura da glicação e da glicação avançada, também os aspectos relativos aos efeitos nocivos da reacção de Maillard *in vivo* se podem encontrar na literatura [103,104,199]. Nos últimos 15 anos tem existido, de facto, progresso na compreensão do papel do *stress* carbonílico e oxidativo *in vivo*, sobretudo no que respeita a determinações específicas da natureza química das variações moleculares, como também da resposta celular face às referidas variações [200]. Todavia, a compreensão das consequências biológicas das modificações químicas específicas ocorridas na glicação requer, por parte de bioquímicos, biólogos e químicos, o desenvolvimento de processos de inibição adequados. É de referir que inúmeras têm sido as estratégias desenvolvidas para inibição da reacção de Maillard *in vivo*, tanto em contextos mais amplos como mais restritos.

Dado o reconhecimento do envolvimento da reacção de Maillard como base interpretativa para os processos reaccionais implicados no desenvolvimento de

determinadas patofisiologias, como a diabetes, e com o envelhecimento, uma estratégia mais específica pode perfeitamente traduzir-se numa intervenção sobre a reacção de Maillard *in vivo*. Todavia, para que isto suceda é necessário o conhecimento da química envolvida na reacção de Maillard. Deste modo, e com base na Fig. 2.4, constata-se que processos estritamente oxidativos e reacção de lipoxidação contribuem para a produção de espécies dicarbonílicas reactivas, como glioxal e glicolaldeído, na reactividade do açúcar glucose. Todavia, e como é sabido, outras fontes nutricionais de açúcares, como frutose, galactose e arabinose, contribuem de um modo significativo para a formação de AGEs *in vivo*. O ácido ascórbico tem igualmente um papel importante na glicação e no *browning* ocorrido ao nível das proteínas do cristalino humano. Para além da referida contribuição de formas açúcar e de espécies carbonílicas reactivas de menor massa molecular, a reacção de Maillard pode ser pragmaticamente dividida em três compartimentos cinéticos, consistindo em “stressores”, i.e. fontes de precursores carbonílicos, “propagadores”, i.e. espécies reactivas de carbonilo, originadas, por conseguinte, a partir dos “stressores”, e “produtos finais” responsáveis por contribuir para a deterioração dos processos moleculares, resultantes da reacção de Maillard [104]. Esta distinção conceptual é, sem dúvida, útil para a definição de estratégias que visam interferir na reacção de Maillard.

2.3.3. Métodos analíticos para identificação, caracterização e localização de produtos da reacção de Maillard *in vivo*.

Dada as variações de cor observadas nos substratos glicados, que se explica pela designação de produtos *browning* nos estudos iniciais da reacção de Maillard, os métodos espectroscópicos pareciam ser inicialmente adequados para descrever os processos de glicação [44,105–110]. Todavia, e com o tempo, o reconhecimento da importância dos métodos espectroscópicos atenuou-se, uma vez que estes métodos apresentam sérias limitações para o estudo de processos reactivos complexos, como é o caso dos processos de glicação. A aplicação dos métodos espectroscópicos apenas proporciona indicações de carácter geral sobre os processos ocorridos, não permitindo contudo a identificação estrutural das espécies moleculares envolvidas. Nas primeiras tentativas realizadas para a identificação de espécies moleculares envolvidas na glicação, fora possível designar as espécies envolvidas, como estruturas de produtos fluorescentes e de natureza *cross-linking*. É de referir que os métodos espectroscópicos

ainda são actualmente usados no estudo dos processos reactivos Maillard, embora em conjugação com métodos separativos, em particular HPLC, onde a baixa especificidade dos métodos espectroscópicos é reforçada pela especificidade inerente em HPLC, apresentando este último método também uma elevada sensibilidade. Torna-se importante referir que apesar das variações espectroscópicas de amostras de proteínas glicadas *in vitro* terem uma relação com a deterioração de determinadas proteínas de longa vida (e.g. colagénio) e o envelhecimento de tecidos, existiu desde muito cedo a necessidade de identificar as espécies moleculares responsáveis por tais variações observadas, bem como de caracterizar os processos reaccionais envolvidos. A primeira definição, referida anteriormente, para as estruturas moleculares envolvidas nos processos de glicação seria insuficiente para contemplar a complexidade dos processos reactivos envolvidos. Posteriormente, a identificação de variadíssimas estruturas químicas, formadas na reacção de açúcares com proteínas, revelou que também existem estruturas AGEs que não são fluorescentes e que podem não ser atribuídas exclusivamente às etapas finais da reacção de Maillard, associado ao facto de que nem todas as estruturas participam no *cross-linking* de proteínas.

Para a obtenção de uma elevada especificidade, foram desenvolvidos e usados métodos imunoquímicos (ELISA) e imunohistoquímicos de modo a estimar os níveis de glicação de proteínas intactas e dos seus correspondentes produtos hidrolisados [201–207]. Os métodos referidos têm conduzido, por vezes, a resultados duvidosos, pois a sua especificidade não é suficientemente elevada para possibilitar a identificação inequívoca das espécies moleculares de interesse nas complexas matrizes fisiológicas. Também uma variedade de métodos de cromatografia líquida e cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa, LC-MS e GC-MS, respectivamente, são rotineiramente usados, no contexto actual, na análise de compostos AGEs antes ou depois das hidrólises ácida ou enzimática de amostras de proteínas [208]. Nos últimos 15 anos, o recurso a técnicas de espectrometria de massa, para a identificação e caracterização de produtos da glicação, tem-se revelado extremamente valioso. Na verdade, e de acordo com a Fig. 2.28, é possível constatar a importância das técnicas de espectrometria de massa nos processos de glicação [52]. A Fig. 2.28 apresenta, na verdade, uma indicação geral dos procedimentos analíticos usados no estudo de proteínas glicadas e de correspondentes produtos formados, resultantes das hidrólises química e enzimática. A espectrometria de massa foi primeiramente usada na determinação de FFI, ao nível dos produtos obtidos por hidrólise ácida da proteínas glicadas *in vitro* [97]. A determinação

fora basicamente realizada por recurso a GC-MS [97]. Um ensaio baseado em GC-MS fora também desenvolvido para a determinação do AGE CML e de ácido eritrónico (EA), em extractos de amostras biológicas [87]. Também, no que respeita ao AGE pentosidina, a espectrometria de massa fora inicialmente aplicada, na identificação do composto [88,100]. De uma forma geral, técnicas de espectrometria de massa, acopladas à cromatografia líquida, têm sido bem sucedidas na identificação, caracterização e quantificação de estruturas AGEs, em relação aos seus processos de síntese e à sua presença nas condições *in vitro* e *in vivo*. A hidrólise ácida, referida anteriormente, é um método frequentemente usado para a análise de proteínas glicadas. Todavia, tem sido verificado que este método conduz à formação de artefactos, que, por vezes, nem sequer têm uma relação com os processos de glicação. Assim sendo, o recurso à hidrólise enzimática apresenta-se como um método mais fidedigno para a determinação dos resíduos de proteínas glicados, e para a investigação das espécies de aductos formados. Uma forma de possibilitar a análise de proteínas glicadas ou nativas, alternativamente aos procedimentos de hidrólises ácida e enzimática, consiste na promoção da sua degradação, por pirólise-GC-MS [209,210]. Neste procedimento, a degradação da proteína ocorre por aplicação de um tratamento térmico rigoroso. Como procedimento alternativo ao uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS), tem-se a electroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (CZE-MS) [211]. Mesmo ao nível da utilização de CZE-MS algumas misturas reaccionais não foram completamente resolvidas devido à sua complexidade, i.e. os vários componentes de uma complexa mistura reaccional não foram totalmente separados [211].

Até aqui apenas se tem referido o estudo de proteínas glicadas por meio do estímulo da sua degradação, através da acção química, enzimática ou térmica. Actualmente existem técnicas de espectrometria de massa que permitem a análise de proteínas intactas, como a espectrometria de massa por ionização com *electrospray* (ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry) [212–216]. Esta técnica permite a análise de compostos polares e não voláteis, directamente da solução para a fase gasosa. Uma outra técnica de espectrometria de massa, que tem sido largamente usada no estudo de proteínas glicadas, traduz-se pela ionização/desorção laser assistida por matriz (MALDI, matrix assisted laser desorption ionization) [217]. Esta técnica MS, em comparação com ESI-MS, pode ser usada na análise de espécies com massas moleculares elevadas.

Actualmente, os métodos mais usados para a detecção de produtos da glicação são os métodos cromatográficos, em particular a cromatografia líquida, acoplados à espectrometria de massa, ELISA e métodos imunológicos. Recentemente, procedimentos imunocitoquímicos e radioimunológicos foram aplicados ao estudo da insulina glicada em animais diabéticos [218].

Em suma, tendo em consideração a complexidade dos processos reactivos envolvidos na glicação, torna-se importante o uso de técnicas analíticas com elevada resolução, sensibilidade e especificidade para a caracterização dos aductos formados ao nível das interações açúcar-proteína, na tentativa de se obter uma informação mais detalhada do ponto de vista das modificações estruturais ocorridas ao nível das proteínas reagidas.

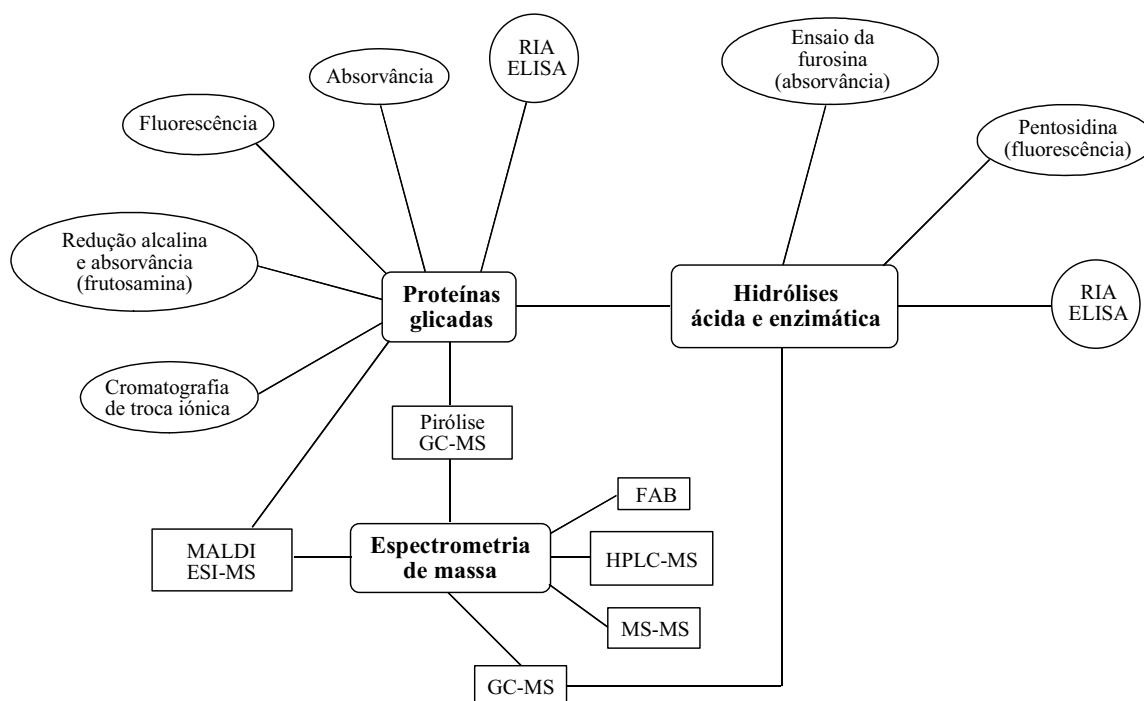


Figura 2.28. Procedimentos analíticos usados no estudo de proteínas glicadas e dos seus correspondentes produtos, resultantes das hidrólises ácida e enzimática (Ref. 52).

2.4. Conclusões.

Tendo a noção de que alterações nas proteínas de indivíduos com complicações diabéticas se mostravam semelhantes às observadas nas proteínas de tecidos envelhecidos [45], surgiu, de facto, a necessidade de uma investigação rigorosa sobre as

alterações proteicas ao nível da diabetes, o que favorece, também, a compreensão da relação fisio-patológica nos organismos. Os primeiros estudos tiveram o seu recurso a métodos espectroscópicos [44,105–110] e apesar das variações da intensidade de fluorescência de amostras de proteínas glicadas se correlacionarem com o envelhecimento das proteínas de tecidos, a intensidade de fluorescência fora inicialmente atribuída à existência de determinados compostos com estruturas do tipo *cross-linking*. Torna-se importante referir que nas proteínas modificadas verificava-se um aumento do fenómeno de glicolização não-enzimática [41–43], concordante com o aumento da massa molecular dos resíduos de proteínas obtidos por hidrólise ácida [41], em comparação com as proteínas nativas. É, deste modo, que surge o envolvimento da reacção de Maillard, bem conhecida no campo da química alimentar, na interpretação dos fenómenos ocorridos ao nível da proteínas *in vivo*. Este processo denomina-se glicação. Com o intuito de melhor se compreender as alterações ocorridas nas proteínas ao nível da glicação, a aplicação de técnicas analíticas como as cromatografias líquida e gasosa, associadas aos métodos espectroscópicos, revelaram a presença de produtos da glicação inicial e avançada, para além do facto de alguns destes produtos não serem necessariamente fluorescentes e/ou *cross-links* de proteína. Deste modo, as espécies reactivas e os relativos processos reaccionais envolvidos na glicação são de uma notória complexidade. Uma boa parte da compreensão dos processos reaccionais envolvidos na glicação *in vivo* tem sido proporcionada pelo estudo de sistemas de reacções modelo, envolvendo compostos de baixa massa molecular e proteínas nativas. É de referir que os principais alvos da glicação *in vivo* correspondem aos resíduos de lisina e arginina e N-terminais das proteínas [93]. No que respeita às espécies de carbonilo reactivas, fora inicialmente reconhecida a importância de açúcares redutores, embora actualmente haja um maior conhecimento da diversidade de espécies reactivas envolvidas na reacção de Maillard *in vivo*, como fragmentos de açúcar, α -dicarbonilos, espécies radicalares, entre outros [91]. A identificação das espécies envolvidas na reacção de Maillard é, pois, de extrema importância para a caracterização do mecanismo reaccional. O produto Amadori, formado a partir do seu precursor base de Schiff, parece ter uma participação crucial no mecanismo da reacção de Maillard *in vivo*. Apesar de existir evidência de que o produto Amadori possa estar envolvido mesmo ao nível da formação de *cross-links* de proteína [75–77], existe indicação de que este pode sofrer degradação, com formação de espécies de carbonilo mais reactivas que os açúcares iniciais [57,86–88,99,134]. Embora nos sistemas *in vitro* as concentrações de compostos α -dicarbonilo, como

glioxal, metilglioxal e 3-deoxiglucosona, seja relevante, de modo a explicar a sua participação nos processos reactivos, verifica-se, ao invés, que as concentrações de dicarbonilo *in vivo* são muito baixas [175]. Assim, tem existido, de facto, alguma reserva na aceitação da reactividade das formas α -dicarbonilo nos processos de glicação *in vivo*. É de notar que a reactividade dos açúcares na reacção de Maillard *in vivo* é externamente complexa, e, numa perspectiva unificadora, têm sido estudadas a reactividades de compostos açúcar análogos, trioses e α -dicarbonilos, estes dois últimos de menor massa molecular que os açúcares [192]. Estas duas últimas espécies reactivas apresentam uma reactividade menos complexa que os açúcares, e podem estar, na verdade, directamente envolvidas na formação de determinados AGEs. A elucidação dos processos reaccionais envolvidos na reactividade de trioses, α -dicarbonilos, e de outros fragmentos de açúcar, pode contribuir para uma melhor compreensão da reactividade das formas açúcares, bem como, também, aceder a um outro contexto que é o do controlo e da inibição da reacção de Maillard *in vivo*. Apesar de existir alguma controvérsia sobre a importância fisiológica dos compostos α -dicarbonilo na glicação, sabe-se que α -dicarbonilos (i) estão certamente envolvidos na formação de estruturas AGEs, embora na sua maioria estas estruturas não se traduzam por estruturas do tipo *cross-linking*; (ii) são caracterizados por uma reactividade mais facilmente compreendida e, por isso, útil para a compreensão da reactividade de formas açúcar superiores – envolvendo processos de reacção irreversíveis e completamente reversíveis; (iii) contribuem para a formação de aductos nas proteínas, aos quais são reconhecidos por receptores específicos na superfície das células; (iv) reagem de forma selectiva com os resíduos de proteínas; (v) são formados na glicação, glicoxidação, peroxidação lípida e na degradação de bases de nucleótidos. O facto de α -dicarbonilos reagirem quimicamente de forma diferente com os resíduos de aminoácidos das proteínas, associado ao facto destes compostos carbonílicos serem reconhecidos ao nível fisio-patológico, realça a importância do estudo de formas carbonílicas simples, o que é, sem dúvida, projectado numa perspectiva mais ampla que o próprio contexto da glicação, para a interpretação de processos fisiológicos e patofisiológicos. Torna-se importante referir que o termo glicoxidação foi introduzido, de forma a contemplar as vias reaccionais envolvidas na glicação que incluem química oxidativa e, como tal, das espécies moleculares participantes. Conceitos como o *stress* oxidativo e o *stress* carbonílico, em particular o último, parecem ter uma contribuição directa na produção

de AGEs, constituindo-se como processos reaccionais alternativos para elucidação da importância fisiológica de AGEs formados a partir de α -dicarbonilos [200].

É de referir que o trabalho de investigação realizado está relacionado com o estudo da reacção de Maillard, mas em fase gasosa por aplicação de técnicas de espectrometria de massa, que podem, de certo modo, traduzir o que se passa em solução. Assim sendo, os resultados obtidos utilizando estas técnicas devem estar em concordância com que se sucede em solução e suportados pela literatura, como é o caso. Num segundo ponto, foram estudados sistemas de reacções modelo, envolvendo os aminoácidos arginina e lisina modificados, e ainda guanidina, e um seu derivado, com α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos. Torna-se importante referir que, embora os sistemas reaccionais estudados pretenderem contribuir para fornecer informação relevante para a reacção de Maillard *in vivo*, uma vez que os resíduos de arginina e de lisina nas proteínas, constituem os alvos preferenciais da glicação *in vivo*, as condições reaccionais estudadas não foram as condições fisiológicas (temperatura de 37 °C; pH ~ 7.4). Este trabalho de investigação teve efectivamente como objectivo um estudo pormenorizado, do ponto vista químico, da reactividade de vários compostos amina de relevância biológica, com a estrutura e a actividade de várias formas α -dicarbonilo, possuindo algumas destas últimas formas também relevância fisiológica, i.e. glioxal e metilglioxal. Deve-se, contudo, ter a noção que, em geral, se torna necessário considerar dois aspectos importantes quando de um estudo de aplicação da reacção de Maillard, como é o caso da sua aplicação *in vitro* e *in vivo*. Um dos aspectos prende-se com a reactividade das espécies e vias reaccionais envolvidas na reacção de Maillard, ao passo que o outro reside na importância fisiológica atribuída a estas espécies e às vias reaccionais envolvidas. O presente trabalho de investigação ocupa-se do primeiro aspecto referido, pelo que era necessário o estudo de espécies e correspondentes vias reaccionais numa vasta gama de condições reaccionais, para além das condições fisiológicas. Na literatura, existe alguma controvérsia relativa a espécies e vias reaccionais envolvidas na glicação. Isto poderá certamente dever-se ao facto de frequentemente apenas se estudar a reacção Maillard em condições reaccionais equivalentes às condições fisiológicas. É de salientar que um estudo aprofundado da reactividade das formas α -dicarbonilo poderá realçar alguns aspectos particulares da sua reactividade, e, assim, auxiliar a atribuição da importância fisiológica destas formas, que frequentemente parece ser ambígua. Este facto também se deve ficar a dever à elevada reactividade das formas α -dicarbonilo, o que reforça ainda o propósito deste trabalho de investigação.

2.5. Bibliografia.

- [1] Maillard L-C. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci. Ser.* 1912; **154**: 66.
- [2] Hodge JE. *J. Agric. Food Chem.* 1953; **1**: 928.
- [3] Schönberg A, Moubacher R. *Chem. Rev.* 1952; **50**: 261.
- [4] McWeeny DJ, Knowels ME, Hearne JF. *J. Sci. Food Agric.* 1974; **25**: 735.
- [5] Ghiron AF, Quack B, Mahinney TP, Feather MS. *J. Agric. Food Chem.* 1988; **36**: 677.
- [6] Huber B, Ledl F. *Carbohydrate Res.* 1990; **204**: 215.
- [7] Tressl R, Nittka C, Kersten E. *J. Agric. Food Chem.* 1995; **43**: 1163.
- [8] Yaylayan VA, Huyghues-Despointes A. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 672.
- [9] Berg HE, van Boekel MAJS. *Netherlands Milk and Dairy Journal.* 1994; **48**: 157.
- [10] van Boekel MAJS, Brands C, em *The Maillard reaction in foods and medicine*. O'Brien J, Nursten HE, Crabbe MJC, Ames JM (eds.), 1998, Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido, pp. 154–158.
- [11] Yaylayan VA. *Trends Food Sci. Technol.* 1997; **8**: 13.
- [12] Berg HE. *Tese de Doutorado*, 1993, Universidade de Wageningen, Holanda.
- [13] Molero-Vilchez MD, Wedzicha BL. *Food Chem.* 1997; **58**: 249.
- [14] Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackedge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW. *Diabetes.* 1994; **43**: 676.
- [15] Lane MJ, Nursten HE, em *The Maillard reaction in foods and nutrition*. ACS symp. series, 1983; **215**: 141.
- [16] Fors S, em *The Maillard reaction in foods and nutrition*. ACS symp. series, 1983; **215**: 1485.
- [17] Teranishi R, Wick EL, Hornstein I, em *Flavour chemistry. Thirty years of progress*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque, 1999.
- [18] Ledl F, Schleider E. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1990; **29**: 565.
- [19] Ames JM, Apriyantono A, Arnoldi A. *Food Chem.* 1993; **46**: 121.
- [20] Tressl R, Wondrack GT, Garbe L-A, Krüger R-P, Rewicki D. *J. Agric. Food Chem.* 1998; **46**: 1765.
- [21] Feather MS, em *Chemical changes in food during processing*, A VI publ. Co, 1985, pp. 289.
- [22] Namiki HE. *Adv. Food Res.* 1988; **32**: 115.
- [23] Friedman M. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 631.
- [24] Rizzi GP. *Food Rev. Int.* 1997; **13**: 1.

- [25] Hashiba H. *Agric. Biol. Chem.* 1982; **46**: 547.
- [26] Hoffman T. *Eur. J. Food Technol.* 1999; **209**: 113.
- [27] Miura M., Gomyo T. *Nippon Nogeikagaku Kaishi.* 1982; **56**: 417.
- [28] Gomyo T, Haiyan L, Miura M, Hayase F, Kato H. *Agric. Biol. Chem.* 1989; **53**: 949.
- [29] Hayase F, Takahashi Y, Tominaga S, Miura M. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1999; **63**: 1512.
- [30] Friedman M. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 631.
- [31] Chuyen NV, Utsunomiya N, Kato H. *Agric. Biol. Chem.* 1991; **55**: 657.
- [32] Pellegrino L, van Boekel MAJS, Gruppen H, Resmini P, Pagani MA. *Int. Dairy J.* 1999; **9**: 255.
- [33] Nagao M, Takahashi Y, Yamanaka H, Sugimura T. *Mutat. Res.* 1979; **68**: 101.
- [34] Yen GC, Tsai LC, Lill JD. *Food and Chem. Toxicol.* 1992; **30**: 127.
- [35] Lee IE, Chuyen NV, Hayase F, Kato H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994; **58**: 21.
- [36] Brands MJ, Alink GM, van Boekel MAJS, Jongen WMF. *J. Agric. Food Sci.* 2000; **48**: 2271.
- [37] Griffith T, Johnson JA. *Cereal Chem.* 1957; **34**: 159.
- [38] Trivelli LA, Ranney HM, Lai H-T. *N. Engl. J. Med.* 1971; **284**: 353.
- [39] Bassirat M. *Tese de Doutorado*, 2002, Universidade de Melbourne, Australia.
- [40] Bakerman S. *Nature (London)*. 1962; **196**: 375.
- [41] Schnider SL, Kohn RR. *J. Clin. Invest.* 1981; **67**: 1630.
- [42] Schnider SL, Kohn RR. *J. Clin. Invest.* 1981; **66**: 1179.
- [43] Vogt BW, Schleicher ED, Wieland DH. *Diabetes.* 1982; **31**: 1123.
- [44] Monnier VM, Cerami A. *Science.* 1981; **211**: 491.
- [45] Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; **81**: 583.
- [46] Tanzer ML, Fairweather R, Gallop PM. *Arch. Biochem. Biophys.* 1972; **151**: 137.
- [47] Tanzer ML, em *Biochemistry of collagen*. Ramachandran GN, Reddi AH (eds.), 1976, Plenum Press, Nova Iorque, cap. 4.
- [48] Labella FS, Paul G. *J. Gerontol.* 1964; **20**: 54.
- [49] Deyl Z, Sulcova H, Praus R, Godman JN. *Exp. Gerontol.* 1970; **5**: 57.
- [50] Monnier VM, Cerami A. *Clin. Endocrinol. Metab.* 1982; **11**: 431.
- [51] Martins SIFS, *Tese de Doutorado*, 2003, Universidade de Wageningen, Holanda.
- [52] Lapolla A, Fedele D, Traldi P. *Mass Spectrom. Rev.* 2000; **19**: 279.

- [53] McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Bailie KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ. *J. Clin. Invest.* 1993; **91**: 2470.
- [54] Berg TJ, Bangstad HJ, Torjesen PA, Osterby R, Bucala R, Hanssen KF. *Metab. Clin. Exp.* 1997; **46**: 661.
- [55] Thornalley PJ. *Cell. Mol. Biol.* 1998; **44**: 1013.
- [56] Westwood ME, Thornalley PJ. *J. Protein Chem.* 1995; **14**: 359.
- [57] Glomb MA, Monnier VM. *J. Biol. Chem.* 1995; **270**: 10017.
- [58] Mlakar A, Spiteller G. *Biochim. Biophys. Acta.* 1994; **1214**: 209.
- [59] Sima AA, Sugimoto K. *Diabetologia.* 1999; **42**: 773.
- [60] Perez M, Cuadros R, Smith MA, Perry G, Avilla J. *FEBS Lett.* 2000; **486**: 270.
- [61] Odetti P, Garibaldi S, Norese R, Angelini G, Marinelli L, Valentini S, Menini S, Traverso N, Zaccheo D, Siedlak S, Perry G, Smith MA, Tabaton M. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; **59**: 393.
- [62] Niwa T, Tsukushi S. *Kidney Int. Suppl.* 2001; **78**: S37.
- [63] Lacovella GM, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. *South Carolina Journal of Molecular Medicine.* 2004; **5**: 73.
- [64] Hayashi T, Mase S, Namiki N. *Agric. Biol. Chem.* 1986; **50**: 1959.
- [65] Keyhani A, Yaylayan V. *J. Agric. Food Chem.* 1996; **44**: 2511.
- [66] Wolff SP, Dean RT. *Biochem. J.* 1987; **10**: 339.
- [67] Zyzak DV, Richardson JM, Thorpe SR, Baynes JW. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; **316**: 547.
- [68] Wolff SP, Barcal ZA, Hunt JV, em *The Maillard reaction in aging, diabetes, and nutrition*. Baynes JW, Monnier VM (eds.), Alan R. Liss, Nova Iorque, 1994.
- [69] Thornalley PJ, Wolff S, Crabble J, Stern A. *Biochim. Biophys. Acta.* 1984; **797**: 276.
- [70] Wells-Knecht KJ, Brinkmann-Frye E, Baynes JW. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
- [71] Okado-Matsumoto A, Fridovich I. *J. Biol. Chem.* 2000; **275**: 34853.
- [72] Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H, Kasai H. *Nucl. Acids Res.* 1997; **25**: 1897.
- [73] Baynes JW, Thorpe SR. *Diabetes.* 1999; **48**: 1.
- [74] Baynes JW, Thorpe SR. *Free Radical Biol. Med.* 2000; **28**: 1708.
- [75] Lederer MO, Bühler HP. *Bioorg. Med. Chem.* 1999; **7**: 1081.
- [76] Biemel KM, Reihl O, Conrad J, Lederer MO. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 23405.
- [77] Biemel KM, Conrad J, Lederer MO. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002; **41**: 801.
- [78] Qian M, Liu M, Eaton JW. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998; **250**: 385.

- [79] Saxena AK, Saxena P, Wu X, Obrenovich M, Weiss MF, Monnier VM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; **260**: 332.
- [80] Qian M, Eaton JW. *Free Radical Biol. Med.* 2000; **28**: 652.
- [81] Loske C, Gerdemann A, Schepl W, Wycislo M, Schinzel R, Palm D, Riederer P, Munch G. *Eur. J. Biochem.* 2000; **267**: 4171.
- [82] Pennathur S, Wagner JD, Leeuwenburgh C, Litwak KN, Heinecke JW. *J. Clin. Invest.* 2001; **107**: 853.
- [83] Araki N, Ueno N, Chakrabarti B, Morino Y, Horiuchi S. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 10211.
- [84] Lal S, Szwergold BS, Taylor AH, Randall WC, Kappler F, Wells-Knecht K, Baynes JW, Brown TR. *Arch. Biochim. Biophys.* 1995; **318**: 191.
- [85] Hamada Y, Araki N, Horiuchi S, Hotta N. *Nephrol. Dial. Transplant.* 1996; **11**: 95.
- [86] Ahmed MU, Dunn JA, Walla MD, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 8816.
- [87] Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 4889.
- [88] Sell DR, Monnier VM. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 21597.
- [89] Wells-Knecht KJ, Brinkmann E, Baynes JW. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
- [90] Brinkmann E, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1995; 2817.
- [91] Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
- [92] Glomb MA, Lang G. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493.
- [93] Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **364**: 1.
- [94] Ahmed N, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **364**: 15.
- [95] Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
- [96] Horiuchi S, Shiga M, Araki N, Takata K, Saitoh M, Morino Y. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 18821.
- [97] Njoroge FG, Fernandes AA, Monnier VM. *J. Biol. Chem.* 1988; **263**: 10646.
- [98] Glomb MA, Pfahler C. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 41638.
- [99] Unno Y, Nagai R, Horiuchi S, Kinae N. *Int. Congr. Ser.* 2002; **1245**: 73.
- [100] Grandhee SK, Monnier VM. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 11649.

- [101] Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 11654.
- [102] Chellan P, Nagaraj RH. *J. Biol. Chem.* 2001; **276**: 3895.
- [103] Rahbar S, Figarola JL. *Curr. Med. Chem. – Immun., Endoc. & Metab. Agents.* 2002; **2**: 135.
- [104] Monnier VM. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 1.
- [105] Bunn HF, Haney DN, Gabbay KH, Gallop PH. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975; **67**: 103.
- [106] Koenig RJ, Blobstein SH, Cerami A. *J. Biol. Chem.* 1977; **252**: 2992.
- [107] Monnier VM, Cerami A, em *Maillard reaction in food and nutrition*. Waller GA (ed.), American Chemical Society, Washington DC, 1983, Vol. 215.
- [108] Monnier VM, Cerami A. *Biochim. Biophys. Acta.* 1983; **760**: 97.
- [109] Monnier VM, Kohn RR, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983; **81**: 583.
- [110] Brownlee M, Pongor S, Cerami A. *J. Exp. Med.* 1983; **158**: 1739.
- [111] Pongor S, Ulrich PC, Bencsath FA, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; **81**: 2684.
- [112] Hayase F, Nagaraj RH, Miyata S, Njoroge FG, Monnier VM. *J. Biol. Chem.* 1989, **263**: 3758.
- [113] Njoroge FG, Sayre LM, Monnier VM. *Carbohydr. Res.* 1987; **167**: 211.
- [114] Kato H. *Agric. Biol. Chem.* 1966; **30**: 822.
- [115] Kato H, Fujimaki M. *Agric. Biol. Chem.* 1970; **34**: 1071.
- [116] Kato H, Sonobe H, Fujimaki M. *Agric. Biol. Chem.* 1977; **41**: 711.
- [117] Nakayma T, Hayase F, Kato H. *Agric. Biol. Chem.* 1980; **44**: 1201.
- [118] Hayase F, Kato H. *Agric. Biol. Chem.* 1985; **49**: 467.
- [119] Nissl J, Pischetsrieder M, Klein E, Severin T. *Carbohydr. Res.* 1995; **270**: C1.
- [120] Nagaraj RH, Portero-Otin M, Monnier VM. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996; **325**: 152.
- [121] Odetti P, Fogarty J, Sell DR, Monnier VM. *Diabetes.* 1992; **41**: 153.
- [122] Chatterjee IB, Bannerjee A. *Anal. Biochem.* 1979; **98**: 368.
- [123] Bailey AJ, Sims TJ, Avery NC, Halligan EP. *Biochem. J.* 1995; **305**: 385.
- [124] Neglia CI, Cohen HJ, Garber AR, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem.* 1985; **260**: 5406.

- [125] Hayashi T, Namiki M, em *Amino-Carbonyl reactions in food and biological systems*. Fujimaki M, Namiki M, Kato H (eds.), Elsevier, Amsterdão, 1986, pp. 29–38.
- [126] Reddy S, Bichler J, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochem. J.* 1995; **34**: 10872.
- [127] Dunn JA, MaCance DR, Thorpe SR, Lyons TJ, Baynes JW. *Biochem. J.* 1991; **30**: 1205.
- [128] Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochem. J.* 1989; **28**: 9464.
- [129] Fu MX, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 9982.
- [130] Ahmed MU, Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochem. J.* 1997; **324**: 565.
- [131] Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. *Biochemistry*. 1995; **34**: 3702.
- [132] Kliegman JM, Barnes RK. *J. Heterocycl. Chem.* 1970; **7**: 1153.
- [133] van Chuyen N, Kurata T, Fujimaki M. *Agric. Biol. Chem.* 1973; **37**: 2209.
- [134] Nagai R, Araki T, Hayashi CM, Hayase F, Horiuchi S. *J. Chrom. B.* 2003; **788**: 75.
- [135] Thornalley PJ. *Biochem. J.* 1990; **269**: 1.
- [136] Philips SA, Thornalley PJ. *Eur. J. Biochem.* 1993; **212**: 101.
- [137] Cai J, Hurst HE. *J. Mass Spectrom.* 1999; **34**: 537.
- [138] Nakamura K, Hasegawa T, Fukunaga Y, Ienaga K. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992: 992.
- [139] Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M, Fujii M, Kitagawa Y, Nakamura N, Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K, Ohta M, Nishimura M, Fukui I, Kondo M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **226**: 37.
- [140] Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; **227**: 227.
- [141] Lederer MO, Gerum F, Severin T. *Bioorg. Med. Chem.* 1998; **6**: 993.
- [142] Büttner U, Gerum F, Severin T. *Carbohydr. Res.* 1997; **300**: 265.
- [143] Nagaraj RH, Shamsi FA, Huber B, Pischetsrieder M. *FEBS lett.* 1999; **453**: 327.
- [144] Hofmann T, Münch P, Schieberle P. *J. Agric. Food Chem.* 2000; **48**: 434.

- [145] Shah MA, Bergethon PR, Boak AM, Gallop PM, Kagan HM. *Biochim. Biophys. Acta*. 1992; **1159**: 311.
- [146] Wang SX, Mure M, Medzihradsky KF, Burlingame AL, Brown DE, Dooley DM, Smith AJ, Kagan HM, Klinman JP. *Science*. 1996; **273**: 1078.
- [147] Smith-Mungo LI, Kagan HM. *Matrix Biol*. 1997; **16**: 387.
- [148] Wang SX, Nakamura N, Mure M, Klinman JP, Sndersloehr J. *J. Biol. Chem*. 1997; **272**: 28841.
- [149] Akagawa M, Suyama K. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2001; **281**: 193.
- [150] Danshvar B, Frandsen H, Auturp H, Dragsted LO. *Biomarkers*. 1997, **2**: 117.
- [151] Akagawa M, Suyama K. *Free Radical Res*. 2002; **36**: 13.
- [152] Requena JR, Chao CC, Levine RL, Stadtman ER. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001; **98**: 69.
- [153] Wolff SP, Jiang ZY, Hunt JV. *Free Radical Biol. Med*. 1991; **10**: 339.
- [154] Hunt JV, Bottoms MA, Mitchinson MJ. *Biochem. J*. 1993; **291**: 529.
- [155] Ortwerth BJ, James H, Simpson G, Linetsky M. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1998; **245**: 161.
- [156] Yim H-S, Kang S-O, Hah Y-C, Chock PB, Yim MB. *J. Biol. Chem*. 1995; **270**: 28228.
- [157] Elgawish A, Glomb M, Friedlander M, Monnier VM. *J. Biol. Chem*. 1996; **271**: 12964.
- [158] Suyama K, Akagawa M, Sasaki T. *Int. Congr. Ser*. 2002; **1245**: 243.
- [159] Reiser K, McCormick RJ, Rucker RB. *FASEB J*. 1992; **6**: 2439.
- [160] Nakamura F, Suyama K. *Arch. Biochem. Biophys*. 1996; **325**: 167.
- [161] Vrhovski B, Weiss AS. *Eur. J. Biochem*. 1998; **258**: 1.
- [162] Akagawa M, Yamazaki K, Suyama K. *Arch. Biochem. Biophys*. 1999; **372**: 112.
- [163] Akagawa M, Suyama K. *Connect. Tissue Res*. 2000; **41**: 131.
- [164] Umeda H, Takeuchi M, Suyama K. *J. Biol. Chem*. 2001; **276**: 12579.
- [165] Westwood ME, McLellan AC, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem*. 1994; **269**: 32293.
- [166] Al-Abed Y, Mitsuhashi T, Ulrich P, Bucala R. *Bioorg. Med. Chem. Lett*. 1996; **6**: 1577.
- [167] Richard JP. *Biochemistry*. 1991; **30**: 4581.
- [168] Watkins NG, Neglia-Fisher CI, Dyer DG, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem*. 1987; **262**: 7207.
- [169] Shapiro R, McManus MJ, Zalut C, Bunn HF. *J. Biol. Chem*. 1980; **255**: 3120.

- [170] Garlick RL, Mazer JS. *J. Biol. Chem.* 1983; **258**: 6142.
- [171] Iberg N, Flückinger R. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 13542.
- [172] Heath MM, Rixon KC, Harding JJ. *Biochim. Biophys. Acta.* 1996; **1315**: 176.
- [173] Nagaraj RH, Shipanova IN, Faust FM. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 19338.
- [174] Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem.* 1998; **273**: 18714.
- [175] Odani H, Shinzato T, Usami J, Matsumoto Y, Brinkmann-Frye E, Baynes JW, Maeda K. *FEBS lett.* 1998; **427**: 381.
- [176] Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **344**: 29.
- [177] Padayatti PS, Ng AS, Uchida K, Glomb MA, Nagaraj RH. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001; **42**: 1299.
- [178] Paul RG, Avery NC, Slatter DA, Sims TJ, Bailey AJ. *Biochem. J.* 1998; **330**: 1241.
- [179] Schwarzenbolz U, Henle T, Haebner R, Klostermeyer A. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1997; **205**: 121.
- [180] Henle T, Walter AW, Haessner R, Klostermeyer H. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994; **199**: 55.
- [181] Konishi Y, Hayase F, Kato H. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1994; **58**: 1953.
- [182] Iijima K, Murata M, Takahara H, Irie S, Fujimoto D. *Biochem. J.* 2000; **347**: 23.
- [183] Odani H, Iijima K, Nakata M, Miyata S, Kusunoki H, Yasuda Y, Hiki Y, Irie S, Maeda K, Fujimoto D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **285**: 1232.
- [184] Glass JD, Pelzig M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1978; **81**: 527.
- [185] Takahashi K. *J. Biochem.* 1977; **81**: 395.
- [186] McClelland RA, Pannicucci R, Rauth AM. *J. Am. Chem. Soc.* 1987; **109**: 4308.
- [187] Pannicucci R, McClelland RA. *Can. J. Chem.* 1989; **67**: 2128.
- [188] Pathy L, Smith EL. *J. Biol. Chem.* 1975; **250**: 557.
- [189] Cotham WE, Metz TO, Ferguson PL, Brock JWC, Hinton DJS, Thorpe SR, Baynes JW, Ames JM. *Mol. Cell. Prot.* 2004; **3**: 1145.
- [190] Syrový I. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 1993; **28**: 115.
- [191] Silero MA, Sillero A, Sols A. *Eur. J. Biochem.* 1969; **10**: 345.
- [192] Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, Kornfield JA. *Biochem. J.* 2003; **369**: 705.
- [193] Ohmori S, Mori M, Shiraha K, Kawase M, em *Enzymology and molecular biology of carbonyl metabolism 2*. Weiner H, Flynn TG, Alan R. Liss, Nova Iorque, 1989, pp. 397–412.

- [194] Taguchi T, Miwa I. *Med. Sci. Res.* 1996; **24**: 781.
- [195] Slatter DA, Murray M, Mailey AL. *FEBS lett.* 1998; **421**: 180.
- [196] Esterbauer H, Gebicki J, Pulh H, Jurgens G. *Free Radical Biol. Med.* 1992; **13**: 341.
- [197] Lederer MO, Klaiber RG. *Bioorg. Med. Chem.* 1999; **7**: 2499.
- [198] Biemel KM, Bühler HP, Reihl O, Lederer MO. *Nahrung/Food.* 2001; **45**: 210.
- [199] Thornalley PJ. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 31.
- [200] Monnier VM, Sell DR, Wu X, Rutter K, em *The Maillard reaction in food chemistry and medical science: update for the postgenomic era*. Horiuchi S, Taniguchi N, Hayase F, Kurata T, Osawa T (eds.), Elsevier, Amsterdão, Nova Iorque, Tóquio, 2002, pp. 15–22.
- [201] Brownlee M, Cerami A, Vlassara N. *N. Engl. J. Med.* 1988; **318**: 1315.
- [202] Bendayan M. *Kidney Int.* 1988; **54**: 438.
- [203] Makita Z, Vlassara H, Cerami A, Bucala R. *J. Biol. Chem.* 1992; **267**: 5133.
- [204] Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shih D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. *Nature.* 1996; **382**: 275.
- [205] Soulis T, Thallas V, Youssef S, Glibert RE, McWilliam BG, Murray-McIntosh RP, Cooper ME. *Diabetologia.* 1997; **40**: 619.
- [206] Sakata N, Imanaga Y, Meng J, Tachikawa Y, Takebayashi S, Nagai R, Horiuchi S, Itabe H, Takano T. *Atherosclerosis.* 1998; **141**: 61.
- [207] Ling X, Nagai R, Sakashita N, Takeya M, Horiuchi S, Takahashi K. *Lab. Invest.* 2001; **81**: 845.
- [208] Lapolla A, Fedele D, Martano L, Arico NC, Garbelio M, Traldi P, Seraglia R, Favretto D. *J. Mass Spectrom.* 2001; **36**: 370.
- [209] Lapolla A, Gerhardinger C, Baldo L, Fedele D, Favretto D, Seraglia R, Traldi P. *Org. Mass Spectrom.* 1992; **27**: 183.
- [210] Lapolla A, Gerhardinger C, Baldo L, Fedele D, Favretto D, Seraglia R, Curcuruto O, Traldi P. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* 1992; **24**: 87.
- [211] Lapolla A, Fedele D, Aronica R, Curcuruto O, Hamdan M, Catinella S, Seraglia R, Traldi P. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995; **9**: 69.
- [212] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4451.
- [213] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4671.
- [214] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 675.

- [215] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1984; **277**: 379.
- [216] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov MV, Nikolaev VI, Shkurov VA. *Zh. Anal. Khim.* 1985; **40**: 1272.
- [217] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1193A.
- [218] McKillop AM, Mooney MH, Harriot P, Flatt PR, O'Harte FP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **286**: 524.

3. Espectrometria de massa.

3.1. Introdução.

Estudos realizados, na viragem do século XIX para o século XX, por aplicação de descargas eléctricas a gases, viriam a revelar que estes se comportavam de forma peculiar, o que muito intrigou a investigação na altura sobre as possíveis alterações da composição dos mesmos, e sobre a possibilidade de existência de espécies ionizadas, as quais poderiam ser estudadas com base nos fundamentos do electromagnetismo, até então estabelecidos [1]. É claro que estas experiências visavam o melhor conhecimento sobre os comportamentos atómico e molecular. Porém, não se pensaria na altura que estas experiências e a construção dos primeiros aparelhos para a observação do comportamento de gases ionizados, poderiam constituir a base para o desenvolvimento de técnicas analíticas de excelência, como a espectrometria de massa. As técnicas de espectrometria de massa evoluíram grandemente no século passado, quer ao nível dos aspectos de instrumentação quer ao nível da compreensão do seu fundamento. Na verdade o desenvolvimento de novos métodos de ionização fora, talvez, o maior impulsionador para o reconhecimento da potencialidade e da aplicabilidade das técnicas de espectrometria de massa que hoje se conhecem. Com a extensão dos métodos de ionização, e.g. a clássica ionização electrónica, a outros métodos de ionização, o tipo de compostos a poderem ser estudados por espectrometria de massa aumentara significativamente, inclui também compostos não voláteis, termicamente instáveis, e altamente polares. Em suma, a espectrometria de massa constitui-se como uma ferramenta importantíssima no contexto da química analítica actual, e também de forma imprescindível no contexto da bioquímica, das ciências biomédicas e biológicas, fornecendo, para isso, informação a vários níveis sobre uma grande variedade de substâncias, com uma elevada rapidez, sensibilidade e especificidade da análise. É de notar que apesar dos significativos avanços das técnicas de espectrometria de massa, esta técnica ainda permanece em contínua expansão, com o desenvolvimento de novos métodos de ionização, do molhamento dos já existentes, bem como do desenvolvimento dos diversos componentes de instrumentação dos espectrometros de massa, de modo a satisfazer a contínua necessidade na análise das mais variadas substâncias, segundo determinados procedimentos analíticos, ou simplesmente em contextos meramente relacionados com os fenómenos que incluem certas substâncias. Talvez a progressão futura da espectrometria de massa seja, mesmo, no sentido de

atender à especificidade dos problemas analíticos que surjam, e de forma intrínseca à mecanística dos fenómenos e processos reactivos que compõem a integridade dos sistemas biológicos e dos problemas biomédicos e analíticos.

Um espectrometro de massa foi, é, e provavelmente será, um aparelho altamente sofisticado e complexo. Todavia, com o auxílio dos meios informáticos e de sistemas computadorizados, a manipulação dos aparelhos hoje em dia não oferece talvez um grau tão elevado de complexidade, como no passado, em que muita da operação era manual ou semi-manual. Na sua forma mais simples, um espectrometro de massa é constituído por três componentes básicos: (i) fonte/câmara de ionização, (ii) analisador(es) de massa e (iii) detector de iões. Em relação às funções básicas de cada um dos componentes mencionados, na fonte de ionização ocorre a produção de iões, em fase gasosa, a partir da amostra, podendo esta última ser sólida, líquida ou gasosa, e é introduzida na região de vácuo através do *inlet* (que pode ser de vários tipos); uma vez formados os iões, na fase gasosa, estes podem ser electrostáticamente conduzidos para o analisador de massa, responsável pela sua diferenciação com base na razão massa/carga (m/z); depois de analisados, os iões são transferidos para o detector, o qual amplifica e dirige o sinal para o registador. Por conseguinte, o resultado obtido no espectrometro de massa é registado na forma do espectro de massa, em que normalmente se representam as abundâncias iónicas, normalizadas ao ião mais abundante, em função da razão m/z . De forma simplificada, tem-se na Figura 3.1 a representação esquemática de um espectrometro de massa.

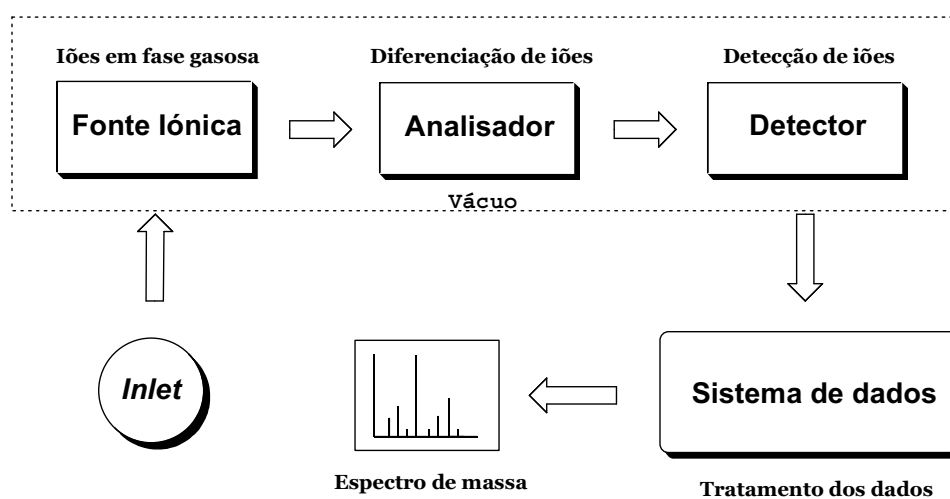


Figura 3.1. Representação esquemática de um espectrometro de massa.

Deste modo, depreende-se que a espectrometria de massa (MS) se trata de uma técnica analítica capaz de determinar a razão massa/carga (m/z) de iões gerados na fase gasosa. É importante referir que nas técnicas de espectrometria de massa os componentes destacados na Fig. 3.1, i.e. fonte iónica, analisador e detector, se encontram sob vácuo. Esta situação não é inteiramente válida para a espectrometria de massa de ionização por electrospray (ESI-MS) e outras técnicas de alta pressão. Em ESI a fonte de ionização encontra-se a uma pressão muito próxima da pressão atmosférica, ao passo que os restantes componentes constituintes do espectrometro de massa, o analisador de massa e o detector, se encontram sob vácuo.

Muito embora a não menor importância das diversas técnicas de espectrometria de massa existentes, bem como os variadíssimos métodos de ionização desenvolvidos ao longo dos anos, será atribuído, neste capítulo, um particular ênfase à espectrometria de massa de electrospray, dado tratar-se de uma das técnicas de espectrometria de massa mais utilizadas no trabalho de investigação de que se ocupa esta dissertação.

3.2. Fonte de ionização.

Apenas com o recurso aos métodos de ionização EI e CI disponíveis poderia ser analisado, por recurso a técnicas de espectrometria de massa, um número limitado de compostos. Com o intuito de expandir o tipo de compostos a analisar, e implicitamente o tipo de amostras, outros métodos de ionização foram desenvolvidos, sobretudo na segunda metade do século XX [1]. Estes novos métodos de ionização, como desorção por plasma (PD), desorção por campo (FD), desorção por laser (LD), espectrometria de massa de iões secundários (SIMS), bombardeamento com átomos rápidos (FAB), electrospray (ESI) e ionização/desorção laser assistida por matriz (MALDI), têm como finalidade a extensão da aplicabilidade da espectrometria de massa à análise de compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis, os quais não podem ser analisados por recurso aos métodos clássicos de ionização EI e CI [1]. Os compostos não voláteis e/ou termicamente instáveis não representam uma dimensão pequena de compostos, ao invés incluem-se nos compostos de interesse biológico e biomédico, cuja a investigação em espectrometria de massa muito tempo ocupou, na tentativa de transformar as suas moléculas em iões na fase gasosa. Estas tentativas foram inicialmente frustradas, na medida em que as moléculas polares e termicamente instáveis, não podiam ser

vaporizadas, sem a ocorrência de decomposição e de degradação extensivas das mesmas. Com efeito, os métodos clássicos de ionização não podem ser aplicados na destes compostos, uma vez que se trata de métodos baseados no “encontro” da molécula a ser ionizada com, por exemplo, electrões, (EI), fotões (LD), iões (CI), átomos ou moléculas electronicamente excitadas (ionização de Penning). Estes “encontros” podem resultar na remoção de uma entidade carregada positiva ou negativamente de uma molécula neutra, ou, pode até por vezes, conduzir à inclusão de uma “entidade”, transformando a molécula num ião [2]. Alguns destes métodos de ionização, como PD, LD e FAB possibilitaram a ionização de espécies moleculares de grandes dimensões, não voláteis e termicamente instáveis. Muita embora este avanço dos métodos de ionização, face aos métodos clássicos de ionização, os resultados obtidos eram, muitas vezes, dificultados devido à “dureza” inerente do processo de ionização, e ao consequente extenso ruído das matrizes de amostra que também se ionizavam, para não falar dos complexos e morosos procedimentos de preparação da amostra, como em FD [2]. Nas últimas duas décadas, do século XX, com o desenvolvimento de métodos de ionização “suave”, como electrospray e MALDI, tornou-se possível obter sucessos muitíssimo significativos na produção de iões intactos, a partir de espécies moleculares de grande de dimensão, e também a diminuição da quantidade e dispersão de partículas no processo de ionização [2]. A vaporização extensiva e não controlada das amostras, sobretudo no que respeita aos processos envolvidos nos primeiros métodos de desorção desenvolvidos, contribuía significativamente para o extenso ruído observado ao nível das análises, o que certamente dificultava a obtenção de informação para os sistemas em estudo.

3.2.1. Fonte de electrospray.

A fonte de ionização por electrospray que hoje se conhece ao nível da espectrometria de massa e das técnicas hifenadas, como a cromatografia líquida e electrofórese capilar acopladas à espectrometria de massa, remonta a um período muito distante, i.e. ao século XVIII, com os trabalhos de Bose [3]. Mais tarde, em 1982, Lord Rayleigh publicara os seus cálculos teóricos sobre a condição que é hoje conhecida como instabilidade de Rayleigh, no contexto do comportamento de entidades carregadas na fase gasosa [4,5]. Todavia, o primeiro estudo sistemático sobre a formação de aerossóis carregados à pressão atmosférica deve-se a Zeleny, em 1914, em que a forma

das gotas de spray emitidas fora investigada em função da voltagem aplicada [6,7]. Posteriormente, em 1937, Chapman investigara a mobilidade de iões produzidos em aerossóis formados a partir de solução aquosas. Soluções de diferentes composições, contendo espécies de açúcares, sais, ácidos, e bases, foram estudadas com o intuito de se observar a libertação de iões, por aplicação de corrente às mesmas [8–10]. Ainda neste trabalho, Chapman verificara a importância do efeito do tamanho do capilar no tamanho e na carga das gotas formadas durante o processo de nebulização [8–10]. Uns anos mais tarde, na década de cinquenta, Vonnegut e Neubauer estudaram a produção de gotas de líquido monodispersas por atomização eléctrica, através da aplicação de uma elevada voltagem a um reservatório de água, a que estava condicionado um capilar [11,12]. Assim, os investigadores estudaram o comportamento do aerosol produzido, variando a conductância da solução e a voltagem aplicada [11,12]. Pouco tempo depois, Drozin sublinhou a importância do dieléctrico do meio e do raio de curvatura do líquido no capilar, ao nível do processo de dispersão do líquido [13]. Este investigador verificara que líquidos não polares, possuindo baixas constantes dieléctricas, não podem ser dispersados por aplicação de uma elevada voltagem [13]. No final dos anos sessenta e início dos anos setenta, Dole e colaboradores publicaram os primeiros estudos do uso do processo de electrospray para a formação de iões na fase gasosa [14–18]. Estes trabalhos centravam-se na investigação da mobilidade iónica de moléculas de polímeros de grande dimensão. Com os resultados obtidos, estabeleceram-se as bases interpretativas do mecanismo de carga residual (CRM), que enuncia a hipótese de que gotas carregadas na fase gasosa são progressivamente vaporizadas até à forma de carga residual, contendo uma única espécie de analito de interesse e a sua respectiva carga associada, i.e. um ião. Os trabalhos de Dole precipitaram futuras investigações sobre a formação de espécies iónicas, na fase gasosa, a partir de aerossóis carregados. Nesta linha de acção, Iribarne e Thomson, nos anos setenta, estabeleceram a hipótese, que sustenta o modelo de evaporação iónica (IEM), de que a emissão de iões na fase gasosa ocorre directamente de gotas pequenas altamente carregadas [19,20]. As teorias propostas predizem que iões que interajam fracamente com o solvente, i.e. iões possuindo baixas energias de solvatação e elevadas actividades superficiais, serão preferencialmente expressos na fase gasosa. Todavia, a verdadeira distinção entre ambas as teorias propostas pode ser atribuída ao nível dos tamanhos das gotas formadas, para gotas contendo raios R compreendidos entre $1 \text{ nm} < R < 10 \text{ nm}$ [21]. Na década de oitenta, Vestal e colaboradores foram, de facto, os primeiros investigadores a usar gotas

carregadas como fonte de ionização para espectrometria de massa [22–24]. Estes estudos também culminaram com o desenvolvimento da técnica de termospray, que possui um fundamento significativamente diferente do processo de electrospray. Em 1984, Yamashita e Fenn [25–27], e Aleksandrov e colaboradores [28,29], combinaram electrospray, como fonte de ionização, com os analisadores de massa convencionais, constituindo-se, assim, a técnica de espectrometria de massa de electrospray, de que hoje bem se conhece, no domínio das ciências analíticas, biomédicas, biológicas e na tecnologia. Nestes trabalhos, de Fenn e de Aleksandrov [25–29], constatou-se, igualmente, que electrospray poderia constituir-se como uma eficiente interface *on-line* para combinação a técnicas de separações líquidas, como a cromatografia líquida e a electroforese capilar, com detecção por espectrometria de massa. A introdução na fonte de electrospray de um fluxo de gás de azoto coaxial ocorrera apenas mais tarde, em 1987, por forma a favorecer o processo de evaporação das gotas carregadas [30]. A introdução de um fluxo de gás de azoto, de modo concêntrico com a produção do aerosol, é particularmente vantajosa, na medida em que uma grande quantidade de moléculas de solvente pode ser removida a partir das gotas formadas, num curto espaço de tempo, sendo por isso bastante conveniente quando da aplicação na fonte de electrospray de fluxos de líquido elevados. Esta utilização, de fluxos de gás de azoto, na fonte de electrospray é particularmente útil para o acoplamento de métodos de cromatografia líquida e de electroforese capilar com detecção por espectrometria de massa. A comercialização dos primeiros instrumentos de LC-ESI-MS ocorreu no final dos anos oitenta e início dos anos noventa, do século XX [31,32]. Nessa altura, Fenn e colaboradores utilizavam as potencialidades da técnica de ESI-MS para a análise de moléculas de biopolímeros com massas moleculares acima de 40 kDa, revelando estas adquirir até 45 cargas positivas na fase gasosa [33]. Este resultado permitia o uso dos analisadores de massa convencionais, como quadrupolos, na determinação de compostos com elevadas massas moleculares. No final da década de noventa do que século passado, foram introduzidas novas modificações nas fontes electrospray, em particular a introdução da fonte de spray ortogonal [34,35]. Nesta configuração, a agulha de electrospray é colocada perpendicularmente ao *inlet* do espectrometro de massa, o que favorece a aplicação de fluxos de operação superiores, resultando numa diminuição da interferência causada por espécies de solvente e por outros contaminantes existentes. Nesta situação, tem-se um aumento da sensibilidade, com

diminuição do ruído, na operação do espectrometro de massa. Apesar de se poder recorrer a fluxos de operação elevados, com a introdução de fluxos de gás corrente, numa orientação ortogonal da fonte de electrospray face ao *inlet* do sistema, tem-se verificado que a redução do fluxo de operação na fonte de electrospray pode ser conveniente reduzido, sem que por isso haja perda de sensibilidade. Assim, têm sido concebidas fontes microspray e nanospray [36,37], com fluxos de operação muito menores, nas fontes nanospray, em particular, em comparação com as fontes electrospray convencionais. A fonte nanospray, em especial, requer o uso de capilares extremamente pequenos, podendo obter-se fluxos de operação muito baixos, o que é conveniente para análise vestigial, com quantidades muito baixas de amostra. Devido ao fluxo de operação em nanospray extremamente baixo, não é necessário o uso de um gás de arraste na fonte, sendo a amostra conduzida apenas pela aplicação da elevada voltagem na fonte. É de salientar que fontes microspray e nanospray podem ser aplicadas mesmo quando do acoplamento de métodos de separação líquida à detecção por espectrometria de massa. Todavia, quer os fluxos produzidos nos sistemas de separação de líquidos quer os fluxos dirigidos para a fonte de spray necessitam de ser regulados. Tem existido alguma indicação de que determinados fenómenos na fonte spray, nomeadamente fenómenos relativos ao comportamento dos processos decorridos na fonte de electrospray, estão intrinsecamente relacionados com o fluxo de operação da fonte, bem como com outras variáveis instrumentais e não instrumentais.

Com esta descrição sobre os avanços no desenvolvimento das fontes electrospray, e sobre os processos ocorridos na fonte, os quais serão abordados posteriormente com maior detalhe, verifica-se que ESI-MS apresenta características particulares, que resultam na sua distinção face a outras técnicas de ionização. Uma primeira característica, em parte já abordada, reside na capacidade de produzir iões multiplamente carregados, i.e. com um número de cargas elevado, reduzindo, assim, a razão m/z , tornando possível analisar compostos de elevada massa molecular, até centenas de kDa, em praticamente todos os tipos de analisador. Uma outra característica prende-se com o facto de as amostras a analisar serem introduzidas na forma de solução, o que favorece o estabelecimento de possíveis acoplamentos com técnicas de separação líquida. E por fim, tem-se o facto de electrospray ser uma técnica de ionização suave, permitindo a preservação de interações não covalentes nas espécies moleculares em solução, quando da sua transferência para a fase gasosa. É de salientar que apesar da

espectrometria de massa de ionização por electrospray permitir a análise de moléculas de elevada massa molecular, através da redução da razão m/z , das correspondentes espécies formadas na fase gasosa, na análise ESI-MS de compostos com massa molecular inferior a 1 kDa normalmente não se observa a formação de espécies iónicas multicarregadas. Torna-se ainda útil referir que o processo de electrospray apresenta como inconveniente o facto de ser difícil a obtenção de análises reprodutíveis. Este facto deve-se ao envolvimento de inúmeros factores, instrumentais e não instrumentais, que controlam o processo de electrospray, responsáveis pela transferência de espécies em solução para espécies ionizadas na fase gasosa. Deste modo, os perfis energéticos da produção e da activação dos iões por ESI são muito menos definidos em comparação com EI. Além disso, em ESI, as energias internas dos iões podem ser modificadas, antes de entrarem no analisador de massa, uma vez que os iões são transportados de uma região à pressão atmosférica para uma região de alto vácuo. Como resultado, o espectro obtido pode variar significativamente com a variação das condições instrumentais (e.g. pressão, voltagem do spray) e não instrumentais (e.g. composição da solução e da fase gasosa). Pode ainda mesmo existir alteração da distribuição de carga de espécies ionizadas, alteração da estabilidade de complexos não covalentes e alteração no índice de fragmentação.

É importante referir que o processo de electrospray não é um processo de ionização, como, por exemplo, a ionização electrónica onde moléculas neutras são convertidas em iões. No processo de electrospray, os analitos em solução, na forma ionizada ou pré-ionizada, são geralmente transferidos da sua fase condensada para a fase gasosa, como entidades individuais [38]. Todavia, não pode ser ignorada a possível ocorrência de reacções ião-molécula, de alterações da natureza e do estado de carga dos iões produzidos na fase gasosa.

3.2.1.1. Características operacionais da fonte de electrospray.

A essência do processo de electrospray pode ser descrita de uma forma simples, apesar de ser necessário alguma reserva, relativamente à descrição sumária dos conteúdos e à importância de alguns fenómenos envolvidos. Assim sendo, em ESI-MS o analito é dissolvido ou preparado num solvente adequado. Normalmente usam-se solventes orgânicos voláteis, como metanol e acetonitrilo. Depois de preparada a amostra líquida (solução) esta é obrigada a passar por uma agulha metálica (agulha de

electrospray), mantida sob a acção de um potencial elevado. O potencial aplicado tem como efeito gerar um campo eléctrico forte na solução que passa, originando a sua dispersão, com formação de um aerosol de gotas altamente carregadas. Estas gotas, no trajecto compreendido entre a fonte e o analisador, vão sendo progressivamente vaporizadas, o que, por sua vez, é estimulado pela temperatura e potencial aplicados no capilar situado no *inlet* do sistema (interface do sistema / região do skimmer), i.e. no ponto do sistema que separa as regiões com diferentes gradientes de pressão. Durante o percurso mencionado, as gotas vão reduzindo o seu tamanho, por evaporação do solvente ou por explosões Coulombicas. Este último fenómeno refere-se à subdivisão da gota resultante dada a elevada densidade de carga que esta possui. Assim, são formados iões completamente desolvatados, através da evaporação completa das moléculas de solvente ou da desorção de iões de gotas carregadas. A nebulização da solução emergente da agulha de electrospray pode ser favorecida pela aplicação de um gás nebulizador. Todavia, o uso de um gás nebulizador para auxiliar na vaporização da solução, que vai emergindo da agulha de electrospray, depende, à semelhança com o que já fora referido, do fluxo de operação desejado. É de notar que na literatura a implementação da fonte de electrospray e sua descrição, envolvem sobretudo espectrometros de massa do tipo quadupolo. Todavia, a fonte de electrospray é também utilizada em instrumentos do tipo ion trap quadrupolar e de transformada de Fourier de ressonância ciclotrónica de ião. A utilização da fonte de electrospray em instrumentos de sector magnético é uma operação mais complexa, na medida em que se torna necessário evitar a activação colisional durante a aceleração dos iões [39–41].

Com esta descrição simplista do processo de funcionamento da fonte de electrospray, é possível, desde já, discriminar três aspectos importantes na produção de iões na fase gasosa, a partir da ionização/vaporização dos analitos em solução, antes da análise de massas: (i) formação e carregamento de gotas na fase gasosa; (ii) redução/diminuição do tamanho da gota, quer por evaporação do solvente quer por desintegração das gotas carregadas, de modo a conduzir à formação de gotas cada vez mais pequenas e altamente carregadas, capazes de originar a formação de iões na fase gasosa; (iii) mecanismos e processos responsáveis pela formação de iões na fase gasosa, através da contemplação dos aspectos da dinâmica, em fase gasosa, de gotas muito pequenas e altamente carregadas. É de referir que na fase gasosa, e após a formação do aerosol na superfície da agulha de electrospray, se formam gotas de vários tamanhos e com várias cargas. Para melhor se compreender o fenómeno responsável pela conversão

de espécies em solução para a fase gasosa, torna-se imprescindível abordar os processos inerentes à dinâmica da evaporação da gotas carregadas. Só assim é possível otimizar as condições de análise em ESI-MS, uma vez que o processo de electrospray constitui um dos processos mais determinantes para a produção de iões na fase gasosa.

3.2.1.2. Teoria e mecanismo de electrospray.

A solução ao passar na agulha de electrospray fica sob a acção de um campo eléctrico fortíssimo, devido ao elevado potencial aplicado na referida agulha. Assumindo um potencial positivo, iões positivos em solução, e provavelmente espécies pré-ionizadas existentes, têm tendência a acumular-se na superfície da agulha, o que origina a formação do cone de Taylor. Para um potencial suficientemente elevado, o cone formado na superfície da agulha de electrospray começa a expandir-se, na forma de filamento. Deste modo, quando a tensão superficial do líquido é superada pela força electrostática aplicada, dá-se a interrupção da forma filamento, com formação de gotas carregadas. Todavia, o diâmetro das gotas formadas é influenciado por um conjunto de factores, incluindo o potencial aplicado, a velocidade do fluxo de solução e as propriedades dos solventes. Tendo em consideração o gradiente de pressão existente na fonte de ionização, que é muito superior ao gradiente existente na região do analisador de massa, a evaporação do solvente nas gotas inicialmente formadas, e consequente redução do diâmetro das gotas carregadas, processa-se no sentido do *inlet* do sistema. Considerando que a região da fonte possui uma elevada pressão, em comparação com as restantes regiões do aparelho, a alto vácuo, um número razoável de encontros colisionais favorece a libertação do solvente das gotas carregadas, e, por conseguinte, a redução do seu diâmetro, antes que estas possam entrar nas regiões de baixa pressão no aparelho, e, por isso, sujeitas a um arrefecimento interno. É de notar que este arrefecimento interno pode não ser favorável para uma consequente evaporação das gotas, sobretudo para gotas de grandes dimensões e menos definidas do ponto vista energético e de separação das cargas criadas. Ainda no processo de redução do diâmetro das gotas carregadas, elas podem sofrer várias desintegrações (fissões), devido à ocorrência de explosões Coulombicas, que, por sua vez, acontece quando a densidade de carga na gota supera a tensão superficial, responsável pela manutenção da gota. Uma contínua redução do tamanho da gota, quer por evaporação do solvente quer por fissão, pode eventualmente resultar na formação de gotas contendo uma única molécula de

analito. Esta molécula de analito origina provavelmente a formação de um ião por retenção da carga da gota, com a evaporação das últimas moléculas de solvente. A activação colisional na interface do sistema pode também favorecer o processo de redução do tamanho das gotas carregadas. Este mecanismo aqui descrito enquadra-se no modelo de carga residual (CRM), proposto por Dole e colaboradores [14–18]. Todavia, apesar dos resultados de Dole e colaboradores, a existência de gotas carregadas, como fonte possível de formação de iões, fora largamente ignorada no contexto da espectrometria de massa, pelo menos até 1979, em surgiram os trabalhos de Iribarne e Thomson, sobre a constituição do modelo de evaporação iónica à pressão atmosférica (IEM) para a formação de iões [19,20]. Neste modelo, a evaporação ou a emissão de iões estabelece-se a partir de gotas muito pequenas e altamente carregadas, através da repulsão existente entre as espécies carregadas e outras cargas existentes na gota. Uma extensão deste modelo acomoda a formação de iões multicarregados em fase gasosa. Neste caso, a formação de iões multicarregados na fase gasosa, deve provavelmente acontecer devido a uma insuficiência na separação das espécies carregadas e de outras cargas na gota. Este fenómeno poderá estar, em muito, condicionado pela formação não apenas de espécies carregadas, mas também de dipolos que hajam sido formados e que, deste modo, enfraquecem a repulsão entre cargas e, consequentemente, a definição de entidades individuais contendo mais que uma única carga. Em moléculas de maiores dimensões, como as proteínas, a ocorrência deste fenómeno será certamente mais importante. Aliás, numa perspectiva interessante, a eficiência do modelo de evaporação iónica muito poderá dizer sobre a natureza do analito em estudo. A importância relativa do modelo de carga residual e do modelo de evaporação iónica é um tema que ainda permanece em discussão. É de frisar que ambos os modelos assumem que a sequência dos passos de evaporação das gotas, seguido de instabilidade de Rayleigh, origina a formação de gotas cada vez mais pequenas. De uma forma geral, um exame mais detalhado dos dois modelos revela que as características espectrais obtidas podem ser explicadas por ambos os modelos. No entanto, tem sido sugerido que o modelo IEM poderá adequar-se mais à ionização de moléculas pequenas, enquanto que grandes moléculas serão ionizadas por um mecanismo mais próximo do modelo CRM [21].

Segundo a perspectiva de Fenn, para a formação de iões a partir de gotas carregadas, existe um número máximo e mínimo de cargas nos iões de determinadas espécies, e há que ter em conta a natureza da distribuição dos iões nos seus correspondentes estados de carga [42]. Isto explica a dependência do estado de carga do

ião formado na configuração da solução da molécula precursora do ião desorvido. A perspectiva de Fenn parece também fornecer indicação sobre a sequência de tempo na qual os iões, com determinados estados de carga, abandonam a superfície da gota em evaporação [42]. Com estes resultados, depreende-se que o modelo de evaporação iónica poderá, em certos casos, ser um modelo mais amplo para a interpretação do comportamento dos iões desorvidos à superfície das gotas, tendo em consideração os diferentes estados de cargas que os iões podem adquirir, o que está certamente relacionado com o comportamento da gota em evaporação; composição da solução e distribuição da carga na gota.

Tem sido estabelecido que o mecanismo inerente ao processo de electrospray deve ser compreendido em duas frentes: (i) formação de iões na fase gasosa a partir de iões, ou de espécies pré-ionizadas, em solução, sujeitas a electrospray à pressão de, aproximadamente, uma atmosfera e (ii) a transferência de iões na fase gasosa, de uma região à pressão atmosférica para uma região de vácuo, com a inclusão de todo o tipo de modificações que podem ocorrer nos iões sujeitos aos vários gradientes de pressão e de campos eléctricos, desde a interface até ao analisador de massa [43].

Kebarle e Tang verificaram que a separação dos iões na agulha de electrospray era um processo essencialmente electroforético, e que esta interface poderia ser considerada como parte de uma célula electrolítica, em que se contempla o transporte de carga na fase gasosa [44–46]. A interpretação do processo de electrospray como uma célula electroquímica na superfície líquido/metal, da agulha de electrospray, fora demonstrada experimentalmente por Blades et al. [47]. Deste modo, se o processo de electrospray pode ser descrito na base do comportamento de uma célula electroquímica, poderá ocorrer oxidação electroquímica na agulha de electrospray, uma vez que esta representa o cátodo da célula, dando assim origem à formação de catiões radicais a partir de analitos neutros. Assim, talvez o processo de electrospray se possa constituir como um verdadeiro método de ionização para certas substâncias, ao invés de ser apenas responsável por transferir para a fase gasosa, como iões, espécies ionizadas ou pré-ionizadas em solução.

Dada a reconhecida importância da natureza electrolítica da fonte de electrospray como base interpretativa para os fenómenos ocorridos no mecanismo de electrospray, os aspectos referentes às características operacionais e comportamentais da

fonte de electrospray, no que respeita aos processos de corrente controlada do fluxo da célula electrolítica irão ser descritos com maior detalhe.

3.2.1.2.1. Produção de gotas carregadas na agulha de electrospray. Fonte de electrospray como célula electroquímica.

Na Figura 3.2 tem-se a representação esquemática de uma fonte típica de electrospray, e o correspondente circuito eléctrico envolvido. Assim sendo, a fonte iónica é composta por dois eléctrodos, designadamente a agulha metálica de electrospray (usualmente de aço inoxidável) e o prato de interface (também de aço inoxidável) do espectrómetro de massa, ambos mantidos à pressão atmosférica, os quais, de certo modo, estabelecem ligação, quando da aplicação da alta voltagem.

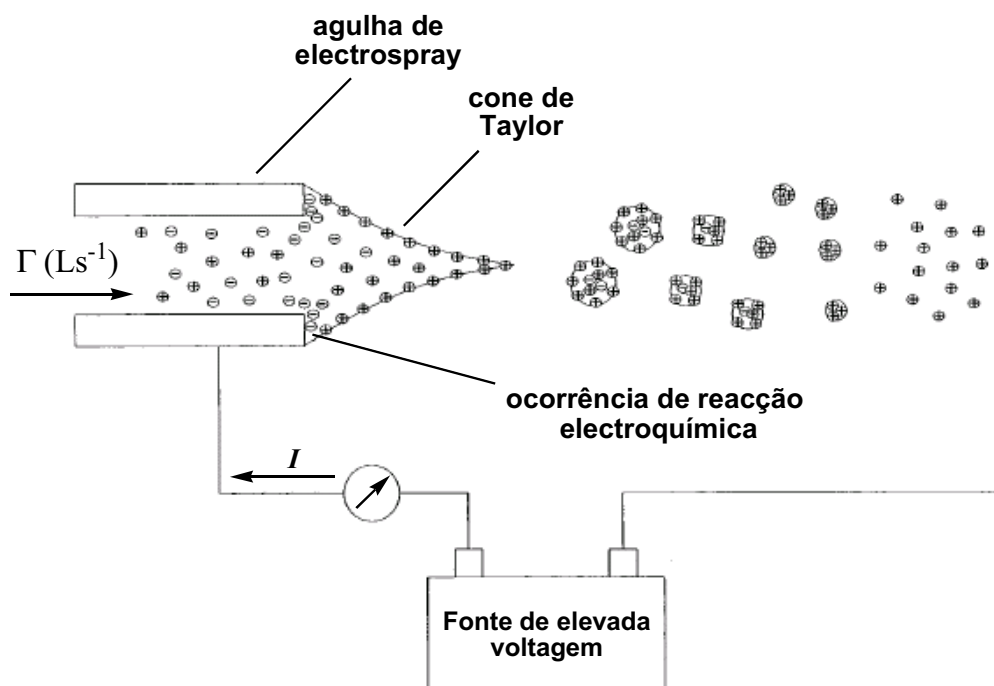
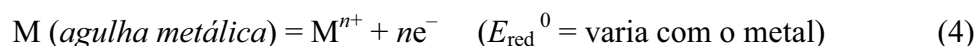
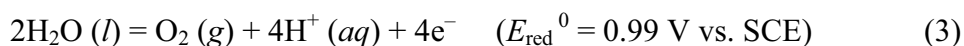
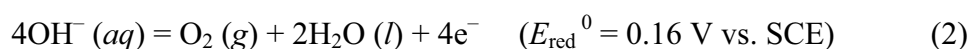
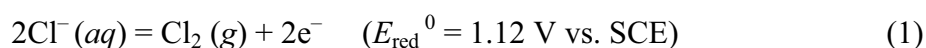


Figura 3.2. Representação esquemática da fonte de electrospray, com a inclusão de alguns aspectos do respectivo processo.

Em condições típicas de operação ESI-MS, a solução contendo o analito de interesse, normalmente iónico ou numa forma pré-ionizada, é forçada a passar pela agulha de electrospray (i.e. eléctrodo de trabalho), mantida a uma elevada voltagem, e vaporizada no sentido da interface (i.e. contra-eléctrodo). A presença de outras espécies iónicas em solução, e.g. electrólitos, deve ser evitada, pois estas espécies iónicas tendem a suprimir

a formação de iões na fase gasosa, a partir dos analitos de interesse [44,45]. Um certo número de iões, para além dos analitos, quer sejam contaminantes ou electrólitos deliberadamente adicionados, devem estar presentes em solução, ou a fonte de electrospray poderá não conduzir à formação de gotas carregadas [46]. Tal acontece porque a separação electroforética dos iões em solução é responsável pela formação e carregamento das gotas de spray. Na verdade, a presença de espécies iónicas nas soluções dos analitos pode ter uma importância maior quando as moléculas dos analitos se encontram numa forma pré-ionizada em solução, o que deste modo pode favorecer a formação e retenção de carga na molécula de analito. Relativamente à influência de um campo eléctrico, iões com a mesma polaridade que a voltagem aplicada na agulha de electrospray migram do seio da solução para o líquido retido na superfície da agulha de electrospray, enquanto que os iões de polaridade oposta migram na direcção oposta à da agulha de electrospray. Com a acumulação de um excesso de iões, com uma polaridade na superfície do líquido, as forças Coulombicas são suficientes para vencer a tensão superficial do líquido, resultando na formação de gotas enriquecidas com polaridade de um dado tipo, a partir da agulha de electrospray. Este fenómeno origina a formação de uma corrente de estado estacionário, no contra-eléctrodo, com a mesma polaridade que a voltagem aplicada na agulha de electrospray [48–51]. A carga oposta acumulada na agulha de electrospray deverá ser neutralizada, por forma a compensar a contínua perda da polaridade das espécies iónicas nas gotas carregadas. Se não for possível atingir esta situação, cria-se um campo eléctrico de polaridade oposta ao da voltagem aplicada, levando ao cessar da formação de gotas carregadas. A corrente na fonte de electrospray é apenas mantida pelos fenómenos que deverão ocorrer ao nível das gotas carregadas. Este processo de regulação de carga na fonte envolve reacções de oxidação e de redução electroquímicas, dos componentes da agulha metálica de electrospray e/ou de uma ou mais espécies presentes em solução. Numa fonte de electrospray a operar no modo positivo ocorrem, na agulha de electrospray (fluxo de electrões na direcção da interface), processos de oxidação. Estes processos de oxidação (modo de ião-positivo) ocorrem devido à acumulação de iões negativos na agulha de electrospray, à perda de um excesso de iões positivos nas gotas, e podem ser compensados pela ocorrência de reacções de oxidação electroquímicas, que resultam na neutralização de iões negativos (equações 1 e 2), e na produção de iões positivos (equações 3 e 4), ou de ambos os processos:



Por outro lado, quando a agulha de electrospray é mantida a uma voltagem altamente negativa (modo de ião-negativo), a acumulação de cargas positivas na agulha de electrospray pode ser compensada pela redução electroquímica de iões positivos, e pela produção de iões negativos, ou por ambos os processos. Como propostas de reacções electroquímicas possíveis, tem-se a redução do oxigénio dissolvido ou de protões. Como se constata pelo tipo de reacções propostas para a ocorrência de oxidação (modo de ião-positivo) ou redução (modo de ião-negativo) na agulha de electrospray, verifica-se que estas reacções envolvem espécies neutras e iónicas, incluindo o metal da agulha de electrospray. Quando da discussão do processo electrolítico, Evans e colaboradores, em 1974, propuseram reacções semelhantes para a incorporação de um spray electrostático, como fonte iónica MS, no que viria a ser designada como espectrometria de massa electrohrodinâmica (EH-MS) [52]. Esta técnica assemelha-se a ESI-MS, na medida em que emprega um spray electrostático, para transferir espécies iónicas, presentes em solução, para a fase gasosa, e consequente análise de massas. Em ESI-MS, os iões na fase gasosa são formados a partir de analitos acomodados em gotas carregadas à pressão atmosférica, enquanto que em EH-MS, são extraídos iões directamente da solução para o vácuo. O circuito de ambos os métodos é análogo, e as características dos processos de compensação de carga ocorridos na agulha de spray deverão ser similares. A ocorrência de reacções electroquímicas é essencial para sustentar a continua produção de gotas carregadas de uma dada polaridade. De forma similar à verificada na agulha de electrospray, é necessário a ocorrência de uma segunda reacção electroquímica no contra-eléctrodo, onde existe uma chegada contínua de espécies carregadas de uma polaridade. No modo de ião-positivo, esta segunda reacção deverá ser uma redução. Logicamente, a reacção electroquímica no contra-eléctrodo, no modo de ião-negativo, deverá ser uma oxidação. Quando esta reacção ocorre, é

completado um tipo especial de circuito eléctrico. De acordo com Kebarle e colaboradores, a fonte de electrospray deverá ser reconhecida como um tipo especial de célula electrolítica, na qual a electrólise mantém a compensação do balanço das cargas por forma a permitir a contínua produção de gotas carregadas [47]. Numa tentativa de explorar a natureza electrolítica da fonte de electrospray, Kebarle e colaboradores envidaram esforços para observar se o metal da agulha de electrospray se poderia oxidar, na esperança de que iões metálicos pudessem ser detectados no espectro de massa [47]. Esta tarefa foi conseguida usando zinco como metal constituinte da agulha de electrospray. A escolha deste metal residiu no facto de ser um metal fácil de se oxidar. Os investigadores constataram a libertação de iões Zn^{2+} da solução, por oxidação da agulha de zinco na fase gasosa [47]. Mais interessante foi o facto de a quantidade de zinco observada (determinada por calibração com sais de zinco), na fase gasosa, corresponder à quantidade necessária para assegurar a corrente na fonte de electrospray, na base da lei de Faraday (equação 5) [47]. Anteriormente a este estudo, Evans e colaboradores observaram a formação de aductos Fe^{2+} no espectro de massa EH, sugerindo a participação do aço inoxidável, da agulha de electrospray, no processo electrolítico [52]. Em termos electroquímicos, a corrente de electrospray (i.e. a corrente na célula electrolítica), i_{ES} , pode ser encarada, obedecendo a considerações do balanço das cargas, como sendo igual à magnitude da corrente das reacções redox ocorridas na agulha de electrospray. O que é equivalente à corrente Faraday do eléctrodo de trabalho na célula electrolítica, i_{F} , e, na base dos resultados de Kebarle e colaboradores [47], respeitante à oxidação na agulha de zinco, na forma de:

$$i_{\text{ES}} = i_{\text{F}} = \sum_j n_j A_j F v_f \quad (5)$$

em que n_j se refere ao número de electrões envolvidos na oxidação de uma molécula da espécie j , A_j é a concentração de espécies j oxidadas e reduzidas, F a constante de Faraday, v_f o fluxo de solução na agulha de electrospray. Apesar dos resultados interessantes de Kebarle e colaboradores [47], estes investigadores não apresentaram evidência directa para a ocorrência de reacções redox, para além das que envolvem o metal da agulha de electrospray. Kebarle e outros investigadores verificaram que, quando do uso de outros metais na agulha de electrospray, como aço inoxidável e prata,

os sinais obtidos na fase gasosa para os iões metálicos de interesse eram menores que o suposto, para se considerar um balanço de cargas completo, tendo em conta a reacção de oxidação na agulha de electrospray [43]. Van Berkel e colaboradores, verificaram, contudo, que certas espécies em solução, segundo condições operacionais apropriadas, podem estar associadas às reacções redox envolvidas no balanço de cargas na agulha electrospray, e os seus correspondentes produtos podem ser eventualmente observados na fase gasosa [53]. Apesar dos resultados não muito conclusivos sobre a fundamentação da natureza e da magnitude dos processos electroquímicos envolvidos na fonte de electrospray (célula electrolítica), e responsáveis por reflectir o balanço de cargas no eléctrodo de trabalho (agulha de electrospray), a ocorrência de processos electrolíticos pode ser vantajosa para fins analíticos.

3.2.1.2.2. Caracterização da fonte de electrospray como célula electroquímica a corrente controlada (CCE).

Motivados pela perspectiva de que a possível natureza electrolítica da fonte de electrospray poderia ser bastante útil para fins analíticos, alguns investigadores envidaram esforços para elucidação do comportamento electrolítico das fontes de electrospray. A natureza electrolítica da fonte de electrospray, i.e. os parâmetros instrumentais que determinam o potencial na interface metal/líquido na agulha de electrospray, responsáveis pela determinação das reacções que possam ou não ocorrer, e outros factores que contribuem para a extensão de reacções específicas ocorridas, não têm sido ainda bem compreendidos. Numa tentativa de refinamento da natureza electrolítica da fonte de electrospray, van Berkel e Zhou realizaram esforços para a caracterização da fonte de electrospray como um dispositivo de corrente controlada, que opera electroliticamente, à semelhança das células electrolíticas de fluxo a corrente controlada convencionais (CCE) [54]. Uma célula de fluxo a corrente controlada consiste numa célula que acondiciona um eléctrodo de trabalho, um contra-eléctrodo, e uma fonte a corrente controlada. O *output* da célula determina a magnitude do fluxo de corrente na célula, o que equivale a dizer corrente da célula, i_c [55–57]. A fonte iónica de electrospray inclui, à semelhança do que se tem referido, dois eléctrodos e uma fonte de corrente controlada (Fig. 3.3).

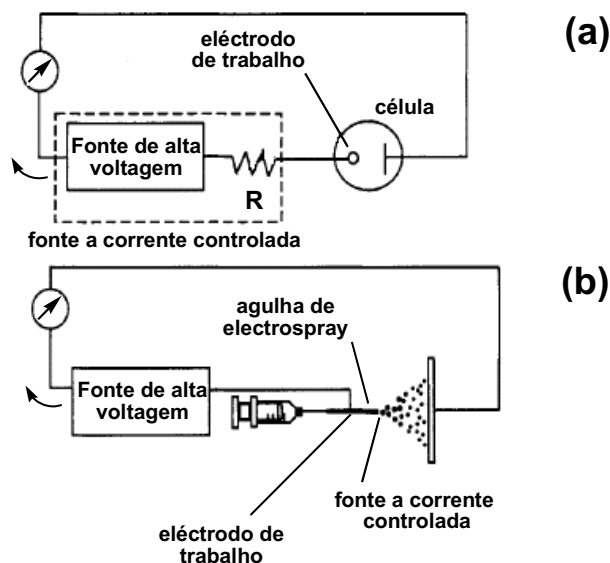


Figura 3.3. Representação esquemática dos componentes instrumentais de (a) uma célula a corrente controlada (CCE) e (b) da fonte iónica de electrospray (ESI) (Ref. 54).

Na perspectiva de van Berkel e Zhou, o processo de formação de gotas carregadas corresponde à fonte de corrente controlada com a “corrente da célula” (i.e. a corrente ES, i_{ES}) igual ao produto da velocidade pela qual as gotas são formadas pelo valor médio de cargas por gota [54]. Alterando o *output* da corrente da fonte, i.e alterando a magnitude de i_{ES} , a velocidade de produção das gotas carregadas e/ou o valor médio de cargas por gota são alterados. Em termos práticos, a alteração do *output* da corrente da célula requer a alteração de um ou mais parâmetros experimentais, como é possível observar na equação teórica de Hendricks (equação 6) [46,58,59],

$$i_{ES} = H v_f^v \sigma_S^n E_{ES}^e \quad (6)$$

$$\left[\sigma_S = \lambda_m^0 C_E; E_{ES} = 2V_{ES} / r_{ES} \ln(4d / r_{ES}) \right]$$

em que H é uma constante cujo valor depende da constante dielétrica e da tensão superficial do solvente, v_f é a velocidade de fluxo na agulha de electrospray, σ_S é a condutividade específica da solução, λ_m^0 é a condutividade molar limitante do electrólito, C_E a concentração do electrólito, E_{ES} o campo eléctrico criado na agulha de electrospray, V_{ES} a voltagem aplicada na agulha electrospray, r_{ES} o raio externo da

agulha de electrospray e d a distância da agulha de electrospray ao contra-eléctrodo (i.e. interface do sistema). De acordo com a equação 6, é possível deduzir-se que o potencial na interface metal (agulha de electrospray) / solução, é função da magnitude da própria corrente ESI, dos potenciais redox, e das propriedades e características do solvente e da solução, e também de algumas características instrumentais e de operação da fonte de electrospray. Ainda considerando a equação proposta (6), é possível afirmar que o potencial na interface metal/solução na agulha de electrospray, i.e. o potencial na interface eléctrodo de trabalho/solução, $E_{E/S}$, responsável pela determinação de quais as reacções redox que poderão ocorrer, assume um valor para cada magnitude da corrente de electrospray, i_{ES} , devendo este valor ser o necessário para oxidar/reduzir espécies em solução suficientes, circundantes à agulha de electrospray, por forma a manter a corrente na fonte de electrospray (i.e. $i_{ES} = i_F$, equação 5). Assim sendo, a oxidação e a redução das espécies individuais, de modo a sustentar i_F , procedem no sentido do aumento dos potenciais redox, até que a corrente necessária seja atingida. A extensão das reacções redox, envolvendo quaisquer espécies em solução, será afectada pela velocidade adquirida pelas espécies no fluxo da agulha electrospray, para uma determinada magnitude i_{ES} , e pela velocidade da transferência de massa das espécies na superfície do eléctrodo de trabalho. Estas considerações são de natureza puramente electroquímica, e respeitantes ao funcionamento das células electrolíticas convencionais. Em suma, as reacções redox que ocorrem, e a sua extensão, são governadas pela magnitude de i_{ES} (relacionada com a natureza dos solventes, condutividade da solução, e com o campo eléctrico criado na agulha de electrospray – equação 6), pelos potenciais redox e concentrações das várias espécies no sistema, incluindo o metal da agulha de electrospray, e pela disponibilidade das espécies para a ocorrência de reacções na interface metal/capilar, sendo esta última determinada pela velocidade de transporte para a superfície, e, por isso, relacionada com outros factores como a dimensão da agulha de electrospray, fluxo da solução na agulha, e concentração das espécies e das suas cargas associadas correspondentes.

Na figura 3.4 tem-se a relação hipotética do potencial na interface eléctrodo de trabalho/solução, $E_{E/S}$, em função da corrente de electrospray, i_{ES} [54].

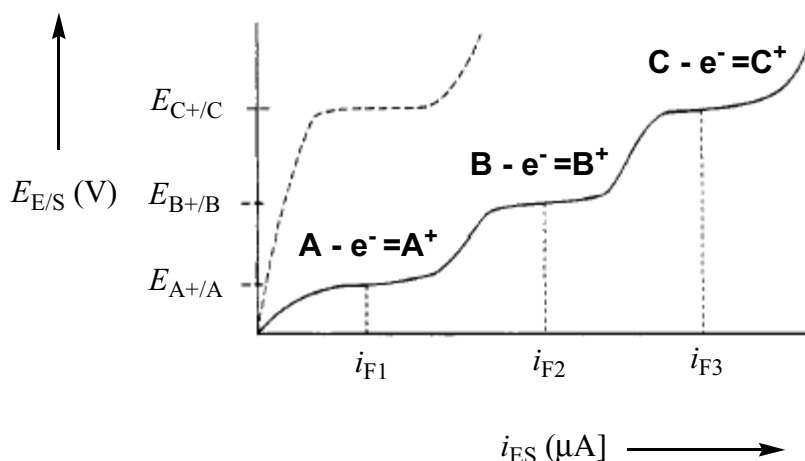


Figura 3.4. Representação esquemática, baseada na operação da fonte de electrospray como célula a corrente controlada CCE, para a interdependência do potencial na interface electrodo/solução, $E_{E/S}$, na agulha de electrospray, em função da corrente de electrospray, i_{ES} , e da composição de espécies electroactivas em solução. Na linha sólida, tem-se a presença de três espécies electroactivas (A, B e C), com os correspondentes potenciais de electrodo $E_{A+/A}$, $E_{B+/B}$, $E_{C+/C}$, e com concentrações equimolares em solução. Na linha a tracejado, tem-se apenas representada a espécie electroactiva C, em solução (Ref. 54).

A linha contínua, na Fig. 3.4, representa a situação de operação da fonte de electrospray no modo de ião-positivo, em que é possível distinguir a contribuição de três espécies electroactivas em solução, e em concentrações equivalentes (espécies A, B e C). As espécies A, B e C descrevem a ordem seguinte para os seus potenciais redox: $E_{A+/A} < E_{B+/B} < E_{C+/C}$, respectivamente. Ainda na Fig. 3.4, verifica-se que quando i_{ES} aumenta, $E_{E/S}$ aumenta também, de forma a que quantidades suficientes destas espécies possam estar disponíveis para reagir, no que respeita à sua oxidação. Como resultado, estas espécies electroactivas são oxidadas na ordem crescente dos seus potenciais de electrodo (Fig. 3.4). Ainda na Fig. 3.4, é possível identificar-se a situação correspondente à presença de uma única espécie em solução (ou de uma única espécie capaz de reagir electroquimicamente), neste caso a espécie electroactiva C. Nesta situação, $E_{E/S}$ será $E_{C+/C}$, uma vez que não existem outras espécies que possam oxidar-se mais facilmente que as espécies C, de modo a manter a corrente necessária. Verifica-se que a corrente de electrospray, i_{ES} , que o potencial desenvolvido na interface metal/solução, i.e. $E_{C+/C}$, pode assegurar, é muito menor, em comparação com a situação descrita anteriormente, para a presença das três espécies electroactivas, A, B e C, em solução. De uma forma geral, verifica-se que a variação da composição de espécies

electroactivas em solução pode alterar significativamente a magnitude de $E_{E/S}$ para uma dada corrente de electrospray, i_{ES} . Resultados experimentais têm, de facto, corroborado a consideração de que a fonte de electrospray possui a natureza de uma célula electrolítica a corrente controlada [47,60,61]. Van Berkel e colaboradores verificaram, na ausência de espécies de electrólitos em solução, a obtenção de correntes de electrospray muito baixas [62]. Neste caso, a oxidação do analito (porfirina) não fora observada na fase gasosa, presumivelmente devido à presença de quantidades suficientes de contaminantes, presentes em solução, os quais podem ser facilmente oxidados, condicionando deste modo a obtenção de níveis baixos de corrente de electrospray [62]. Depreende-se, também, com estes resultados que o potencial interfacial na agulha de electrospray, $E_{E/S}$, será menor que o seu mínimo necessário para oxidar o analito porfirina. Todavia, quando a magnitude de i_{ES} aumenta, quer pelo aumento da concentração da espécie de electrólito em solução (e como tal da condutividade) quer por aumento do potencial interfacial, $E_{E/S}$, a oxidação da porfirina fora observada. Outros resultados que suportam a natureza CCE da fonte de electrospray, como a adição de um electrólito facilmente oxidável (ferroceno), às soluções de porfirina, conduziu ao término da oxidação do analito porfirina, enquanto que a adição de antraceno (mais difícil de se oxidar), nas mesmas condições, não resultara na observação da oxidação do composto adicionado [54].

Apesar da descrição dos processos electrolíticos na fonte de electrospray se adequar particularmente aos casos em que os produtos de electrólise são não-iónicos ou que possuam baixos coeficientes de desorção, deve ser notado que quando soluções aquosas são empregues, existe a possibilidade do pH da solução ser alterado pela ocorrência de processos redox, os quais deverão ser avaliados quando do estabelecimento de correlações entre as distribuições iónicas na fase gasosa e em solução. Estes aspectos foram estudados em detalhe por van Berkel e colaboradores, que fizeram ainda notar que a magnitude da alteração da composição das espécies electroactivas em solução pode ser particularmente pronunciada quando: são utilizados baixos fluxos de solução (i.e. $\leq 1.0 \mu\text{L min}^{-1}$), como em nanospray, dado o uso de soluções não tamponadas próximas do pH neutro, e o uso de agulhas metálicas de electrospray ou de metais de contacto, com a solução, difíceis de se oxidar (e.g. ouro e platina) [63]. Nos casos mencionados, é muito provável que se altere significativamente durante o processo de electrospray a disponibilidade de protões, relativamente a outros catiões nas gotas finais. Torna-se claro que esta variação pode influenciar

substancialmente as abundâncias iónicas das moléculas protonadas e multiprotonadas em relação a outras espécies catiónicas em solução, e poderá também ter um efeito imediato na distribuição do estado de carga de espécies multiprotonadas. Estes dois factores podem ter grande número de consequências que deverão ser tidas em consideração no contexto da análise quantitativa. Para finalizar, Cook e van Berkel e colaboradores destacaram a importância da produção de gases, como produto adicional, nas reacções electrolíticas ocorridas nos sistemas de baixo fluxo ESI-MS [63,64]. Assim sendo, a formação de bolhas de gás na agulha de electrospray pode ocasionar instabilidade no spray, ou até mesmo impedir o contacto da solução com o metal da agulha electrospray, mantido a uma elevada pressão, e perturbando, por conseguinte, o processo de produção de gotas carregadas, e em sentido lato o processo de formação do aerosol [63].

No contexto da natureza CCE da fonte de electrospray, verifica-se que considerações operacionais da célula CCE podem ser amplamente transcritas para o processo de electrospray. A ocorrência de processos electrolíticos na fonte de electrospray apresenta algumas desvantagens na análise por ESI-MS, mesmo ao nível de determinadas condições operacionais e instrumentais da fonte de electrospray (e.g. fluxo de solução na agulha de electrospray, composição da solução a analisar, constituição do material da agulha, voltagem aplicada), e que são motivo de alguma reserva sobretudo no contexto da análise quantitativa. Todavia, é possível tecer considerações sobre a natureza electrolítica da fonte de electrospray de uma forma extremamente vantajosa, sobretudo ao nível da análise qualitativa. A fonte de electrospray pode ser usada para ionizar electroquimicamente espécies variadas de analitos, o que pode contribuir para o aumento da sensibilidade de análise e detecção por ESI-MS, de forma a incluir certos tipos de analitos neutros que de outro modo não poderiam ser analisados por ESI-MS. Nesta perspectiva, poderá falar-se mesmo numa expansão universal da fonte de electrospray como fonte de ionização. Os analitos mais propensos a ionização electroquímica e detecção por ESI-MS deverão formar espécies iónicas relativamente estáveis quando da oxidação/redução electrolítica. Este requisito é necessário, uma vez que os iões formados electroquimicamente devem ser capazes de sobreviver na solução durante o tempo da sua formação na agulha de electrospray até à sua vaporização e transporte, como iões discretos na fase gasosa, ao nível do espectrometro de massa [43].

3.2.1.2.3. Evolução das gotas carregadas e formação de iões na fase gasosa.

A ocorrência do processo de electrospray conduz à formação de gotas carregadas, em que a corrente total das gotas (TDC) se mostra dependente da presença de cargas, que resultam de um excesso de iões positivos, formados na separação parcial de iões electrólito positivos de negativos, na região do cone de Taylor. Assim, a ocorrência do processo electrospray é dependente da presença de electrólitos em solução, sendo $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ concentração mínima necessária para estas espécies de [46,50]. Acima deste limite de concentração, a corrente total das gotas $TDC = I$ aumenta muito lentamente com o aumento da concentração das espécies de electrólito. De la Mora e Loscertales [65], com base em medidas teóricas e experimentais, propuseram a seguinte equação,

$$I \approx \text{constante} \times (\gamma K V_f \epsilon / \epsilon_0)^{1/2} \quad (7)$$

em que γ é a tensão superficial, K a conductividade da solução, ϵ permitividade da solução, ϵ_0 permitividade do vácuo, V_f velocidade de fluxo da solução na fonte de electrospray. Estes últimos investigadores [65] também propuseram relações (equações 8 e 9) para o raio R e carga q das gotas inicialmente formadas na agulha de electrospray,

$$R \approx (V_f \epsilon / K)^{1/3} \quad (8)$$

$$q = 0.7[8\pi(\epsilon_0 \gamma R^3)^{1/2}] \quad (9)$$

em que os símbolos das equações 8 e 9, comuns aos da equação 7, têm o mesmo significado, que o exposto anteriormente. Com base nas equações 8 e 9, constata-se que para concentrações elevadas de electrólito a conductividade da solução (K) aumenta, conduzindo a uma diminuição do raio das gotas iniciais (R). Segundo experiências realizadas com o electrólito NaCl, Kobarle e Peschke verificaram que com o aumento da concentração de NaCl, o raio e o número de cargas elementares das gotas precursoras (N_p) diminuíam, numa magnitude semelhante em ambos [66].

Numa condição ideal do processo de electrospray, a evaporação das moléculas de solvente das gotas iniciais, formadas à pressão atmosférica, origina a diminuição do raio das gotas, embora mantendo uma carga constante q . É nesta situação que o raio das

gotas evaporadas se aproxima da instabilidade de Rayleigh, sendo a carga resultante dada por:

$$q = 8\pi(\epsilon_0\gamma R^3)^{1/2} \quad (10)$$

onde a repulsão Coulombica entre as cargas na gota supera a força coesiva da tensão superficial, anteriormente responsável pela integridade das próprias gotas carregadas. Este fenómeno conduz à ocorrência de explosões Coulombicas nas gotas. Na Figura 3.5, ilustrando os sucessivos eventos de explosões Coulombicas das gotas precursoras, tem-se um esquema de decomposição das gotas carregadas [58,67]. As gotas resultantes da evaporação do solvente, experimentam explosões Coulombicas, que conduzem à formação de uma segunda geração de gotas, cujos raios se encontram à escala do nanómetro, possuindo estas apenas algumas cargas elementares (Fig. 3.5). É de referir que o esquema de decomposição apresentado na Fig. 3.5 tem apenas uma validade qualitativa [58].

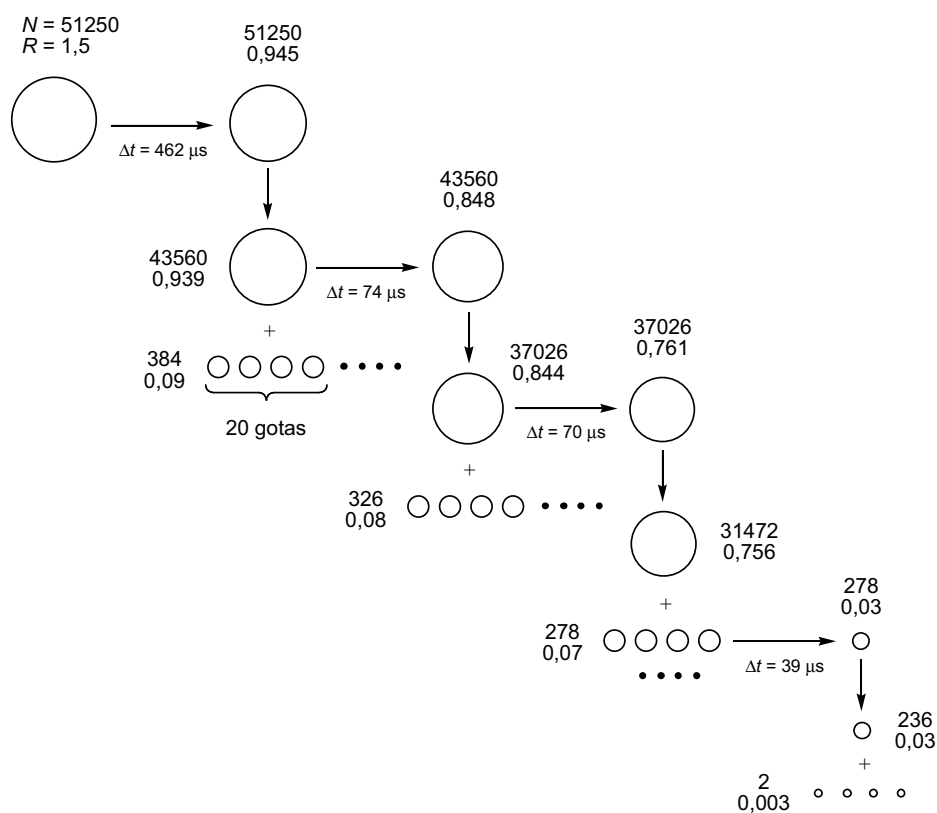


Figura 3.5. Esquema para a evolução temporal das gotas carregadas por evaporação do solvente, considerando que a gota adquire uma carga constante e que experimenta explosões Coulombicas, no limite da instabilidade de Rayleigh. A primeira gota representada encontra-se no limite da instabilidade de

Rayleigh, conduzindo à formação de 20 gotas, através da perda de 2 % da sua massa e de 15 % da sua carga. No esquema, tem-se ainda a representação da variação do número de cargas elementares da gota (N_p) e do raio (R) (em μm) das gotas em função do tempo, no decurso de eventos de explosões Coulombicas de gotas precursoras e de correspondentes gotas resultantes (Ref. 58).

Têm sido várias as tentativas realizadas de modo a examinar a validade do modelo IEM, desde a proposta mecanística de Iribarne e Thomson [19,20]. Aliás, o esquema de decomposição das gotas, proposto por Kebarle e Tang [58], fora testado na base dos modelos CRM e IEM, mas apenas fora utilizado em termos de considerações qualitativas. Kebarle e Peschke [66] desenvolveram uma nova estratégia para a validação dos modelos IEM e CRM, com base no esquema de decomposição da Fig. 3.5 [58]. Assim, os investigadores compararam as abundâncias dos iões M^+ , $M(\text{MX})^+$, $M(\text{MX})_2^+$, $M(\text{MX})_n^+$ observadas nas soluções aquosas, contendo um único electrólito MX (NaCl), com uma dada concentração, C_{MX} . Estas abundâncias observadas foram comparadas com as abundâncias esperadas, recorrendo ao esquema de decomposição das gotas (Fig. 3.5). As gotas iniciais foram monitorizadas até à formação do resíduo sólido. Esta situação ocorrera após ~ 25 explosões Coulombicas da gota inicial, resultante de uma solução aquosa de 5×10^{-3} M NaCl [66]. Na verdade, os investigadores observaram uma boa concordância entre os espectros de massa experimentais e calculados, o que, de facto, reforça a validade de IEM para a interpretação do processo de evolução das gotas carregadas em ESI-MS [66]. Todavia, os investigadores verificaram, na observação dos espectros de massa, que não existia uma boa concordância entre os espectros de massa experimentais e calculados, na base do modelo CRM [66]. Gamero-Castaño e de la Mora [68] verificaram, à semelhança de Kebarle e Peschke [66], que os iões $M(\text{MX})_n^+$, observados no espectro de massa, podem ser produzidos por evaporação iónica. Apesar do esquema da Fig. 3.5, para a decomposição de gotas carregadas na fase gasosa [66], se mostrar útil como base interpretativa para a evolução das gotas na fase gasosa, é necessário ter alguma reserva na sua utilização, pois o esquema não compreende gotas maiores que 1 μm , nem fora estabelecido para os solventes convencionais usados em ESI-MS, como água e metanol, entre outros.

No intuito de validar a aplicabilidade do modelo IEM para a evolução de gotas carregadas na fase gasosa, Loscertales e de la Mora [69] desenvolveram uma

metodologia diferente, das existentes até então. Estes investigadores tentaram interpretar a evolução de gotas muito pequenas na fase gasosa, como forma de contornar a impossibilidade directa de observação do processo [69]. Assim, neste estudo, a carga q determinada para um dado raio fora menor que a carga necessária para a instabilidade de Rayleigh (equação 10). Este resultado é concordante com o facto da evaporação iónica substituir as explosões Coulombicas, quando as gotas carregadas descrevem um raio pequeno. Com a obtenção de R e de q , e do campo eléctrico determinado experimentalmente, para uma série de resíduos sólidos com diferentes R , fora possível, no estudo de Loscertales e de la Mora, obter informação, do ponto vista cinético, para o processo de evaporação de gotas carregadas muito pequenas [69]. Os resultados obtidos, e correspondente interpretação, podem ser considerados como uma evidência da validade do modelo IEM para a interpretação da evaporação de iões pequenos. É de referir que neste estudo, o uso da densidade do sal sólido MX, como densidade do resíduo sólido formado, pode não ser inteiramente satisfatório, uma vez que a morfologia do resíduo sólido pode ser bem mais complexa, e a sua densidade pode ser menor que a dos cristais do sal MX. Gamero-Castaño e de la Mora [70], numa outra publicação, usaram uma metodologia experimental mais sofisticada, que a de Loscertales e de la Mora [69], para o estudo da importância dos resíduos sólidos formados na interpretação da evolução das gotas carregadas na fase gasosa. Com efeito, os investigadores usaram dois analisadores de mobilidade diferencial (DMA) em *tandem*, de modo a estudar a mobilidade dos resíduos sólidos formados [70]. Entre os analisadores, uma câmara estava acondicionada, sendo responsável por conduzir à redução da carga dos resíduos sólidos, por exposição ao ar, e também à ionização dos mesmos, por irradiação com partículas α [70]. Estas experiências [70] possibilitaram ainda o estudo de resíduos sólidos de menor tamanho, que os estudados por Loscertales e de la Mora [69]. À semelhança do estudo dos dois últimos autores [69], Gamero-Castaño e de la Mora [70] determinaram a carga, o raio dos resíduos sólidos, e o campo eléctrico imposto nestes resíduos. Com estas determinações fora possível obter informação do ponto de vista do tratamento cinético realizado, obtendo-se, mais uma vez, evidência de que o modelo IEM é o mecanismo mais plausível para a produção de iões pequenos em ESI-MS [70]. Muito embora a importância dos resultados obtidos neste estudo, existem alguns aspectos que não são muito convincentes, como o facto dos autores assumirem que o processo de neutralização do resíduo sólido, a uma única

carga, não alterara o diâmetro dos iões formados [70]. Porém, a irradiação de partículas α à pressão atmosférica, produz no ar iões negativos, como O_2^- , HCO_2^- , CO_3^- e NO_2^- . Como a natureza dos resíduos sólidos parcialmente neutralizados, resultantes da reacção de resíduos sólidos multicarregados com as espécies aniónicas referidas acima, não é conhecida, não se sabe se houve ou não alteração do diâmetro do resíduo sólido.

Até agora apenas se tem tentado abordar os aspectos da evolução da gotas carregadas na fase gasosa, considerando os eventos relevantes que contribuem para a decomposição das gotas, i.e. evaporação do solvente, explosões Coulombicas e evaporação de iões. Quando uma gota carregada sofre explosão Coulombica, as gotas resultantes são formadas a partir do solvente, próximo da superfície da gota. Uma vez que a distribuição de carga na gota se pode acumular mais à superfície da gota, as referidas gotas resultantes são enriquecidas em carga, em comparação com as gotas iniciais. Taflin et al. demonstraram experimentalmente este fenómeno, através do condicionamento de microgotas individuais sob a acção de campos eléctricos, estudando o tamanho e a carga da gota, após a ocorrência de explosão Coulombica [71]. Estes investigadores determinaram que quando a gota sofre explosão Coulombica, perde 10 a 18 % da sua carga, e apenas 1 a 2 % da sua massa [71]. É de notar que estes valores são concordantes, em termos da consistência da literatura, embora tenham sido determinados através do uso de solventes orgânicos, como dodecanol e heptadecano, os quais não se traduzem pelos solventes usualmente utilizados em ESI-MS [72]. Apesar da questão dos solventes, os resultados de Taflin et al. [71] prevêm que explosões Coulombicas conduzem a uma distribuição desigual da carga e da massa, relativamente às gotas precursoras. Tem aliás sido assumido que esta distribuição desigual da massa e da carga pode ter um efeito significativo na quantidade de analito carregado durante o processo de ESI-MS. Considerando que as espécies de analito têm diferentes afinidades para a superfície da gota carregada, é possível prever que a resposta de analitos com grande afinidade para o interior da gota possa ser largamente influenciada pela separação desigual da massa e da carga, quando da explosão Coulombica. Neste caso, as espécies de analito dispostas no interior da gota poderão permanecer na gota inicial, quando da formação da nova geração de gotas. Cech e Enke exploraram este assunto de forma teórica, através do estudo do efeito da actividade superficial na quantidade de analito carregado durante a explosão Coulombica [72]. Contemplando o analito na superfície e no seio da gota carregada, os investigadores demonstraram que a afinidade superficial do analito pode ser significativa para a determinação da fracção do analito

que pode estar carregada durante a explosão Coulombica [72]. Se um analito tem uma afinidade muito grande para com o interior da gota, apenas uma fracção muito pequena das moléculas de analito podem estar carregadas durante o processo de ESI, mesmo que uma abundância de excesso de carga esteja disponível nas gotas carregadas [72].

3.2.1.2.4. Dependência da sensibilidade em ESI-MS da natureza química do analito, da sua concentração e da presença de outras espécies de electrólitos.

Até aqui têm-se tecido algumas considerações sobre o efeito na produção de iões na fase gasosa, de determinadas condições de operação do espectrometro de massa ESI-MS, como a voltagem aplicada na fonte ESI, o fluxo do gás de arraste, o fluxo da solução, a temperatura na interface. Em conjunção, têm-se igualmente examinado os processos envolvidos na evolução das gotas carregadas e na produção de iões na fase gasosa, que incluem maioritariamente a evaporação do solvente, a ocorrência de explosões Coulombicas e a evaporação iónica. Estes processos têm sido abordados quer para soluções contendo iões ou espécies pré-ionizadas de pequena e/ou de grande dimensão. Fenómenos como a desolvatação dos iões, reacções de transferência protónica, e os episódios de repulsões Coulombicas, no que respeita à evolução de gotas carregadas contendo macro-íões, como as proteínas e entidades associadas, merecem também um destaque particular, tendo em conta a aplicação extensa de ESI-MS no contexto da ciências biológicas e biomédicas. Apesar das considerações tecidas até este ponto, outras considerações têm sido igualmente abordadas na literatura, no que respeita aos processos ocorridos na fase condensada (solução), e a aparência do espectro de massa de ESI resultante. Considerações iniciais relativas à solução, como a concentração do analito, conformação do analito, concentração de espécies de electrólito presentes, pH da solução, natureza ácido/base das espécies de analito, polaridade do solvente, podem ter uma contribuição importante nas abundâncias iónicas observadas para as espécies de analito detectadas, e podem até mesmo auxiliar na compreensão dos processos inerentes ao mecanismo de electrospray, os quais muito têm ocupado determinados grupos de investigação [43]. É de referir também que através deste tipo de considerações tem sido possível a exploração de determinados modelos, que utilizam a evidência experimental, os quais têm auxiliado as teorias de produção de iões na fase gasosa, face à interpretação do mecanismo de electrospray e aos fenómenos ocorridos na fonte de electrospray [43]. É de acrescentar que a tomada de atenção

relativa às considerações iniciais de solução, ao nível do sinal obtido para as espécies de analito detectadas no espectro de massa ESI-MS, pode também fornecer indicações valiosas sobre a correlação entre comportamento das espécies de analito em solução e na fase gasosa. Aliás, este assunto constitui um aspecto importante do ponto de vista da utilidade analítica da técnica de ESI-MS e da sua aplicabilidade, pois é sempre desejável que ao analisar uma espécie na fase gasosa haja preservação das suas características estruturais e comportamentais, em relação às correspondentes espécies na fase condensada.

Questões relativas às abundâncias iónicas esperadas em ESI-MS, para um dado analito, com uma determinada concentração em solução, são frequentes na base diária da utilização da técnica de ESI-MS. A tentativa de compreensão dos factores determinantes para as abundâncias iónicas observadas, conduz muito rapidamente a questões relacionadas com o mecanismo de electrospray, abordado em secções anteriores. Tang e Kebarle determinaram experimentalmente abundâncias de iões, para soluções de analitos, com diferentes concentrações, analisadas por ESI-MS (Fig. 3.6) [43,58,73]. Como é possível verificar-se na Fig. 3.6a, as abundâncias iónicas de espécies de analito, obtidas ao nível do espectro de massa, aumentam com o aumento da concentração do analito em solução [43,58,73]. Também na Fig. 3.6, se pode observar importância do uso de coordenadas logarítmicas, de modo a compreender a importante gama de abundâncias iónicas e de concentrações representadas. Ainda na Fig. 3.6, se verifica que existem duas regiões de concentração de espécies de analito, em que as correspondentes abundâncias iónicas descrevem variações distintas [43,58,73]. Assim, para concentrações de analito, desde o limite de detecção até concentrações de $\sim 10^{-5}$ M (região de baixa concentração), as abundâncias iónicas observadas no espectro de massa ESI variam linearmente com o aumento da concentração do analito em solução [43,58,73]. Esta secção linear, ilustrada na Fig. 3.6a, apresenta um declive próximo da unidade. Porém, para concentrações de analito superiores a 10^{-5} M até concentrações relativas ao limite máximo de detecção (i.e. $10^{-3} - 10^{-2}$ M) (região de elevada concentração), observa-se uma saturação das abundâncias iónicas no espectro de massa, com tendência para a sua diminuição, para concentrações de analito elevadas [43,58,73]. É de referir que a secção linear referida, onde a abundância do analito é proporcional à sua concentração em solução, representa uma região útil para a quantificação de espécies de analito em solução [43,45,74–77]. Esta região é vulgarmente designada por gama linear dinâmica (*dynamic linear range*). No mesmo

estudo, Tang e Kebarle determinaram as abundâncias iónicas de espécies de electrólito presentes em solução, como os iões Na^+ e NH_4^+ [43,58,73]. Para além das espécies de analito em solução, outras espécies de electrólitos, como espécies coanalito, estão também presentes como impurezas, devido ao solvente usado, as quais podem também provir do uso de tampões, frequentemente necessários ao nível de técnicas de separação líquida, como cromatografia líquida e electrofórese capilar, acopladas à detecção por espectrometria de massa [43,58,73]. Na Fig. 3.6a tem-se uma situação distinta da descrita para a relação das abundâncias iónicas das espécies de analito com as correspondentes concentrações em solução, para espécies de electrólito impureza [43,58,73]. Deste modo, na região de baixa concentração do analito, as abundâncias iónicas do electrólito impureza não variam. Na região de elevada concentração do analito, as abundâncias iónicas do electrólito impureza diminuem rapidamente, em especial para concentrações de analito elevadas. Estes resultados, auxiliados pelos obtidos para a variação das abundâncias iónicas das espécies de analito, permitem concluir que na região de baixa concentração do analito, a corrente de electrospray I é mantida pela presença do electrólito dominante, neste caso do electrólito impureza, presente na solução, com uma concentração constante, de $\sim 10^{-5}$ M [43,58,73]. Na região de elevada concentração do analito, existe uma fraca dependência da corrente I da concentração total das espécies em solução. Esta situação pode ser facilmente compreendida por observação da Fig. 3.6b, pois a corrente de electrospray aumenta ligeiramente com o aumento da concentração do analito em solução, na região de elevada concentração do analito, descrevendo, por isso, uma variação semelhante à obtida para a abundância iónica total, I_{total} (Fig. 3.6a) [43,58,73]. Em geral, o aumento da concentração de um electrólito não é responsável por um aumento significativo da corrente iónica I , uma vez que as variações de I são bastante pequenas, mesmo quando a concentração do electrólito aumenta significativamente [43]. Aliás, I é independente da natureza do electrólito [43]. Sabendo que nas gotas carregadas, formadas ao nível do aerosol produzido na agulha de electrospray, espécies de analito competem com espécies de electrólito, no processo de produção de iões na fase gasosa, a proporcionalidade das concentrações de analito e de electrólito, na região de elevada concentração de analito, conduz a uma diminuição da produção de iões electrólito na fase gasosa, do que resulta a observada diminuição das abundâncias de espécies electrólito impureza no espectro de massa (Fig. 3.6a). É de notar que os resultados

obtidos por Tang e Kobarle são concordantes com os obtidos por outros investigadores, revelando-se, deste modo, como os resultados comuns observados na análise de soluções por ESI-MS, contendo um único analito na presença de solvente [43,58,73]. É de notar ainda, na base dos resultados obtidos por Kobarle e Tang, que, para concentrações de analito inferiores a 10^{-5} M, o processo ESI é apenas possível devido à presença de espécies de electrólito impureza [43].

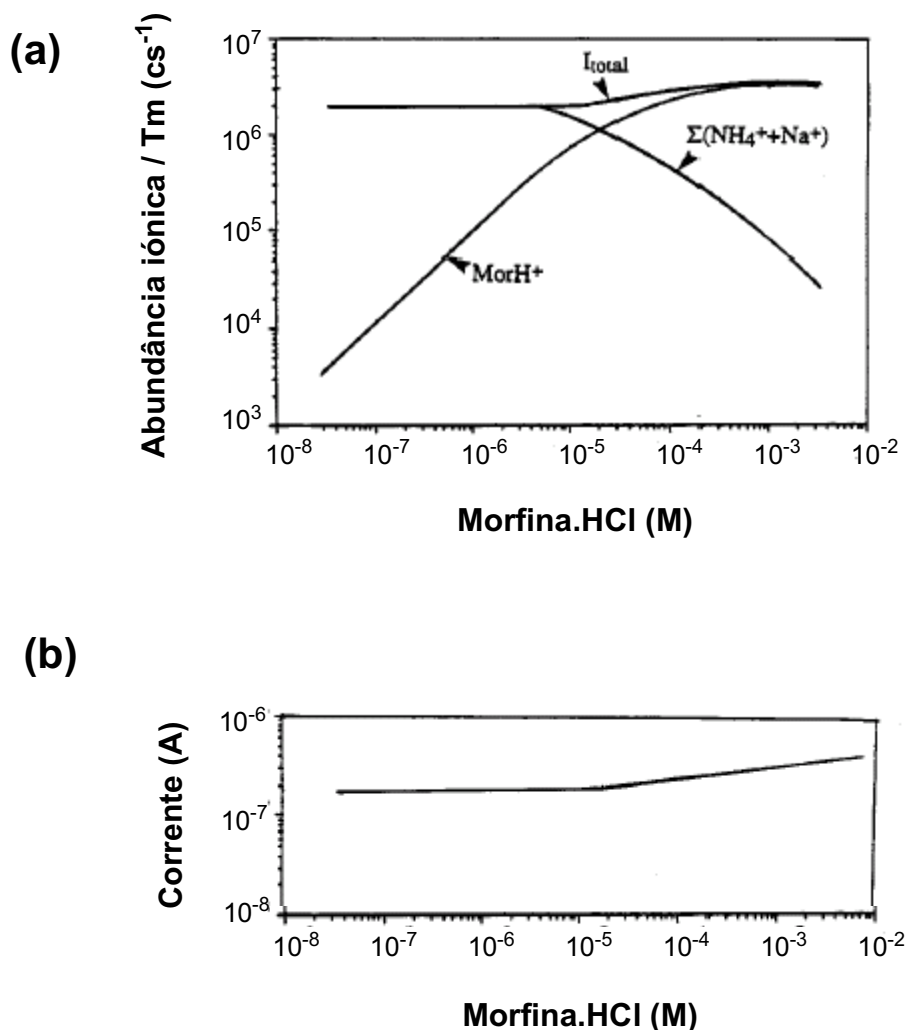


Figura 3.6. Dependência da abundância iónica (a) e da corrente de electrospray (b) da concentração do analito em solução; soluções de dois componentes (analito A^+X^- + impureza de electrólito). Os iões do electrólito impureza (maioritariamente Na^+ e NH_4^+) estão presentes nos solventes usados em ESI-MS, como a água e o metanol, com uma concentração constante de $\sim 10^{-5}$ M (Ref. 58).

Tang e Kebarle, em 1991, propuseram um modelo, baseado na hipótese de que a velocidade de evaporação dos iões, a partir de gotas carregadas, seria proporcional à concentração do ião na gota [43,45,58,73]. A base do modelo proposto por Tang e Kebarle [43,45,58,73] assenta no modelo IEM, anteriormente estabelecido por Iribarne e Thomson [19,20]. Deste modo, a fracção da corrente iónica das espécies de analito fora representada como fracção da velocidade da formação iónica total. Assim, para um sistema de dois componentes (analito + electrólito), obtem-se a seguinte equação:

$$I_{A^+,ms} = pf \frac{k_A[A^+]}{k_A[A^+] + k_E[E^+]} I \quad (11)$$

em que o analito AX se dissocia em A^+ e em X^- , e o electrólito EX, se dissocia em E^+ e em X^- , em solução. Para simplificação, optou-se por assumir que o modo de ião-positivo, e a natureza dos contra-íões X^- não fora especificada. A equação (11), para um sistema de três componentes (dois analitos + electrólito), toma a seguinte forma:

$$I_{A^+,ms} = pf \frac{k_A[A^+]}{k_A[A^+] + k_B[B^+] + k_E[E^+]} I \quad (12)$$

em que AX e EX têm o mesmo significado que na equação 11, e o analito BX se dissocia em B^+ e em X^- , em solução. Nas equações 11 e 12; $I_{A^+,ms}$ corresponde à corrente dos iões A^+ , determinada no espectrometro de massa; $[A^+]$, $[B^+]$ e $[C^+]$ são as concentrações iniciais das espécies de analito e de electrólito (mol L^{-1}), na solução analisada por ESI-MS; I é a corrente total de electrospray, que pode ser determinada experimentalmente; o produto pf corresponde a um produto de constantes de proporcionalidade, em que p é a eficiência de amostragem no espectrometro de massa ESI, ou melhor, a fracção de iões detectados no espectrometro de massa relativamente aos iões produzidos na fase gasosa a partir de gotas carregadas a 1 atm e f é a fracção de cargas nas gotas que foram convertidas em iões na fase gasosa; os coeficientes k_A , k_B e k_E traduzem a “eficiência” relativa com que as espécies A^+ , B^+ e E^+ são convertidas em iões na fase gasosa, respectivamente. É de referir que equações para I_B e I_E são análogas às representadas para I_A . Além disso, interessa também mencionar o facto de que as

correntes iónicas detectadas I_A , I_B e I_C , para efeito da aplicação das equações 11 e 12, devem ser corrigidas, devido à dependência da razão m/z da transmissão do espectrometro de massa. Ainda em relação ao produto fp , o valor de p depende da qualidade da interface, enquanto que o valor de f depende da qualidade das gotas produzidas. O produto fp é um factor independente da natureza química dos iões. Quer p quer f dependem das condições actuais, em que p pode variar tipicamente entre 0,5 e 0,8, enquanto que f é geralmente mais pequeno, e é inteiramente dependente dos arranjos de amostragem dos iões na fase gasosa [43,45,58,73]. O produto fp pode ser determinado a partir de medidas da corrente iónica total e da corrente de electrospray I [43]. Assim, para um sistema de dois componentes (analito + electrólito), o produto fp pode ser determinado através da seguinte equação (13):

$$I_A + I_E = fpI \quad (13)$$

Para variações da natureza e da concentração dos electrólitos em solução, fp revelou-se aproximadamente constante até uma concentração total de $\sim 5 \times 10^{-4}$ M, o que não é de todo imprevisto, uma vez que o produto fp é independente da natureza química dos iões [43,45]. Tang e Kobarle obtiveram uma estimativa de $f \approx 0,3$, através do uso de metanol como solvente ESI [43,45]. Também estes investigadores observaram uma diminuição de fp para concentrações superiores a $\sim 5 \times 10^{-4}$ M, devido a uma possível diminuição de f , dado o aumento do tamanho da gota para concentrações elevadas dos componentes nas soluções [78]. Todavia, resultados obtidos por outros investigadores prevêm não um aumento mas sim uma diminuição do diâmetro da gota com o aumento da conductividade (i.e. com o aumento da concentração do electrólito) [65,79–81]. É de notar que valores de p próximos da unidade, como os referidos anteriormente (0,5 e 0,8) podem ser obtidos por nanospray [43].

Por recurso à equação 11, é possível interpretar a dependência das abundâncias iónicas, observadas no espectro de massa, para um dado analito, com a concentração do analito em solução. Como a variação da corrente de electrospray I é semelhante à variação observada para a abundância iónica total, I_{total} , [43,45,58,73] será lógico deduzir que a variação da abundância iónica para uma dada espécie deverá reflectir a corrente iónica, observada no espectrometro de massa, para a mesma espécie. Deste modo, por aplicação da equação 11, verifica-se que na região de baixa concentração do

analito (região linear), a abundância iónica do analito será dependente da concentração das espécies de electrólito presentes em solução, existindo, estas últimas, com uma concentração constante e mais elevada que a do analito. Na mesma região de concentração do analito, o aumento da abundância iónica do analito está pois apenas dependente dos incrementos na concentração do analito em solução, uma vez que a concentração do electrólito é constante, de que resulta a variação linear observada, entre a abundância do analito no espectro de massa ESI e a sua correspondente concentração em solução (Fig. 3.6a) [43,45,58,73]. Na região de elevada concentração do analito, com o aumento da concentração do analito em solução, em relação à concentração do electrólito impureza, o quociente da equação 11 tende a evoluir para a unidade, o que, de facto, justifica a saturação das abundâncias iónicas das espécies de analito, observadas no espectro de massa ESI (Fig. 3.6a) [43,45,58,73]. Relações semelhantes podem ser deduzidas para a variação das abundâncias iónicas das espécies de electrólito com a concentração do analito em solução, i.e. por recurso à equação 11, em ordem a I_{E^+} .

As equações 11 e 12 reflectem a competição dos iões em solução para a fase gasosa. Na equação 11, por exemplo, a corrente iónica das espécies A^+ , I_{A^+} , depende da razão k_A/k_E , e não dos valores individuais k_A e k_E . A razão k_A/k_E reflecte a razão das quantidades dos iões A^+ e E^+ , produzidos na fase gasosa, em relação às correspondentes concentrações em solução [43]. A razão k_A/k_E pode ser determinada através da razão da equação 11, para a corrente iónica das espécies A^+ e E^+ , respectivamente, na forma de:

$$\frac{I_A}{I_E} = \frac{k_A [A^+]}{k_E [E^+]} \quad (14)$$

A razão k_A/k_E pode ser determinada experimentalmente, para condições de concentração em que $[A^+] \neq [E^+]$, tendo em atenção a equação 11 [43,45,58,73]. Porém, a referida razão k_A/k_E pode ser também determinada, e numa forma mais conveniente, através da aplicação da equação 14, para condições de concentração em que $[A^+] = [E^+]$ [43,45,58,73]. Para um sistema de três componentes (analitos A^+ e B^+ + electrólito E^+), a razão k_A/k_B é determinada de forma análoga à referida para k_A/k_E , uma vez que se obtém uma equação do tipo da equação 14 através da razão das expressões das correntes iónicas dos analitos A^+ e B^+ (equação 12), e também devido ao facto de o electrólito

impureza estar presente em solução com uma concentração constante. A razão k_A/k_B é constante na gama completa de concentração quando $k_A = k_B$. Bons ajustes experimentais (ESI-MS) têm sido, de facto, obtidos para as intensidades iónicas I_{A^+} , I_{B^+} e I_{E^+} , na base da equação 12, embora seja apenas observado um ajuste exacto, com uma razão k_A/k_B constante, por aplicação da equação 14, quando $[A^+] = [B^+] > 10^{-5}$ M [43,45,58,73]. Para concentrações $[A^+] = [B^+]$ inferiores, a razão dos coeficientes diminui para o limite $k_A/k_B = 1$ [43,45,58,73].

Tang e Kebarle, na consequência do modelo proposto, também determinaram experimentalmente a razão dos coeficientes k_A/k_B , para uma série de soluções de três componentes (analitos A^+ e B^+ + electrólito E^+) analisadas por ESI-MS, através da aplicação da equação 14 para concentrações de analito $[A^+] = [B^+]$ elevadas [43,45,58,73]. Iões inorgânicos monocarregados como analitos, e.g. Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ , NH_4^+ possuem, segundo Tang e Kebarle, coeficientes k semelhantes, enquanto que iões analito que tenham tendência a acumular-se na superfície da gota, i.e. analitos superficialmente activos, apresentam coeficientes k mais elevados, em comparação com os das espécies iónicas inorgânicas referidas [43,45,58,73]. Na Fig. 3.7 tem-se uma ilustração da situação anterior [43,45,58]. Deste modo, nas soluções dos analitos K^+ e Cs^+ analisadas por ESI-MS, verificou-se que a razão k_A/k_B era constante, na gama completa de concentração (Fig. 3.7a) [43,45,58]. Para além disso, em soluções dos catiões tetraalquilamónio Pen_4N^+ e Et_4N^+ , por exemplo, a razão dos coeficientes variara, nas regiões de baixa e de alta concentração dos analitos, sendo a razão k_A/k_B superior na região de elevada concentração do analito, em comparação com a respectiva razão na região de baixa concentração, que se aproximava da unidade (Fig. 3.7b) [43,45,58,73]. Uma situação, de algum modo semelhante à situação anterior, fora igualmente observada quando da análise por ESI-MS das soluções dos analitos $C_{11}NH_3^+$ e Cs^+ , em que se verificara que a razão k_A/k_B , para elevadas concentrações dos analitos, fora superior, relativamente à razão para concentrações baixas dos analitos determinada (Fig. 3.7c) [45]. O única diferença desta última situação, em comparação com a segunda situação mencionada, reside no facto da razão k_A/k_B determinada, para concentrações baixas dos analitos, não se aproximar da unidade.

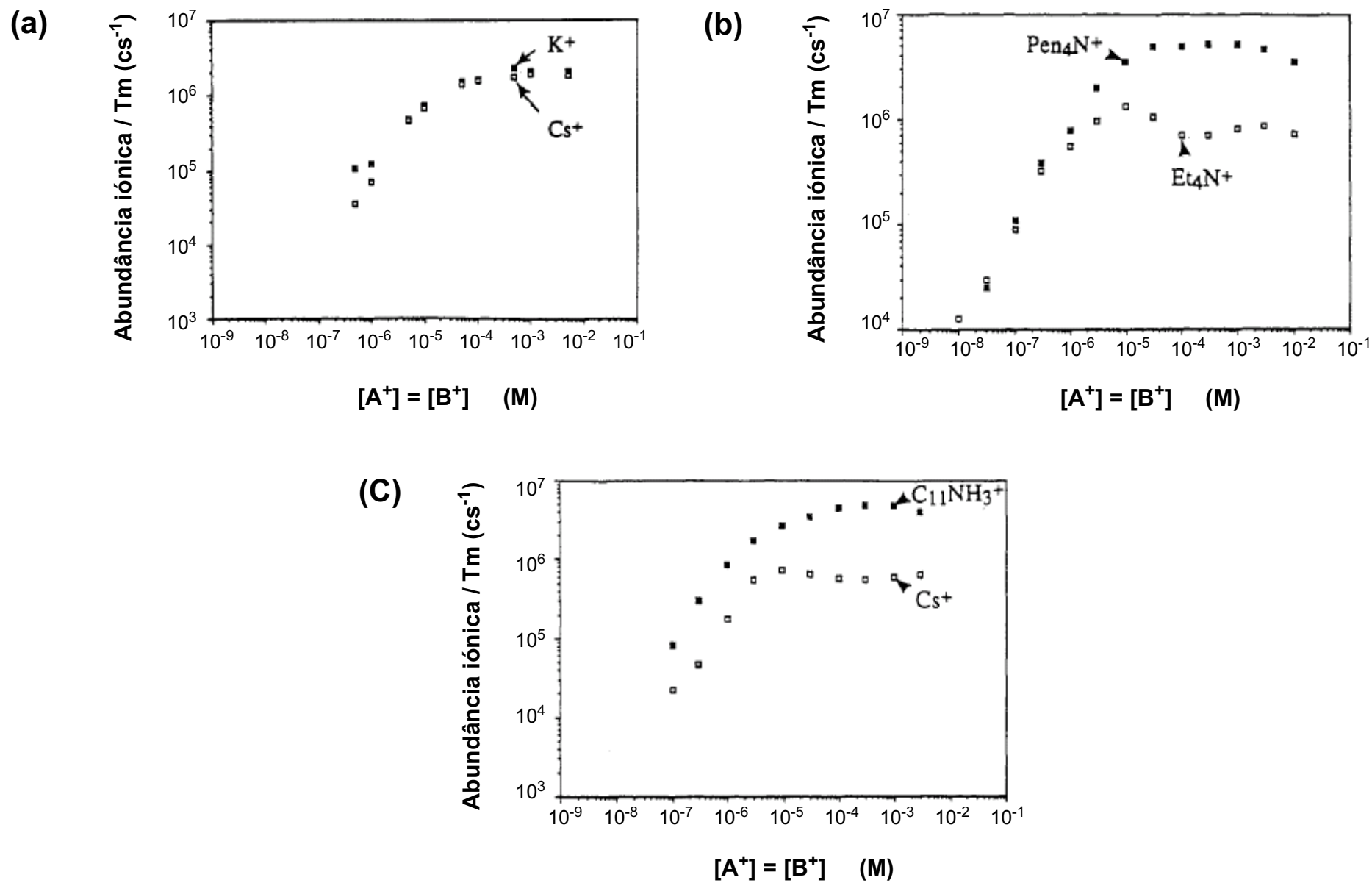


Figura 3.7. Abundâncias iônicas observadas para os analitos A^+ e B^+ em função das suas concentrações em solução, considerando $[A^+] = [B^+]$ (Ref. 58).

Os factores responsáveis pelas variações observadas para a razão dos coeficientes determinada experimentalmente foram explorados, segundo o modelo de evaporação iónica de Iribarne e Thomson, o qual fora extendido de modo a incluir o efeito da actividade superficial dos analitos [43,45,58,73]. Neste caso, fora assumido que o coeficiente k_A dos iões A^+ dependerá da população relativa de iões A^+ na superfície das gotas carregadas. Por outras palavras, o coeficiente k_A deverá depender não apenas da constante de evaporação iónica k_I , mas também da constante K_S , que reflecte o equilíbrio iónico no seio e na superfície da gota carregada [43,45,58,73]. É de notar que, na teoria de evaporação iónica, k_I é proporcional ao produto das constantes $K_S k_I$ [19,20]. Deste modo, a equação (15) proposta por Tang e Kebarle para a produção de iões na fase gasosa, segundo um modelo IEM, extendido à contemplação do efeito da actividade superficial dos analitos, assume a seguinte forma [43,45,58,73]:

$$\frac{k_A}{k_B} = \frac{K_{SA} k_{IA}}{K_{SB} k_{IB}} \quad (15)$$

em que K_{SA} e K_{SB} representam as constantes relativas ao equilíbrio dos iões A^+ e B^+ , respectivamente, no seio e na superfície da gota, e k_{IA} e k_{IB} as constantes de evaporação dos iões A^+ e B^+ , respectivamente.

Tang e Kebarle também consideram o efeito da actividade superficial das espécies de analito, segundo o modelo de carga residual (CRM) [43,45,58,73]. Assim, iões que se acumulem na superfície da gota serão preferencialmente transferidos para a superfície de gotas produzidas, a partir de gotas precursoras, uma vez que as cargas na superfície de gotas de uma nova geração são originadas através das cargas na superfície de gotas precursoras [43,45,58,73]. Assumindo que o processo se repete, é possível deduzir que as gotas finais produzidas, a partir de gotas precursoras de várias gerações, e que contém apenas um excesso de cargas, apenas incluirão preferencialmente iões que são superficialmente activos [43,45,58,73]. Nesta última situação, o excesso de carga não deverá localizar-se na superfície da gota final, uma vez que não existem outras cargas que possam conduzir o excesso de carga formado para a superfície da gota [43,45,58,73]. Deste modo, é de esperar que os coeficientes k dos analitos dependam apenas na actividade superficial dos analitos, de acordo com a seguinte expressão (16):

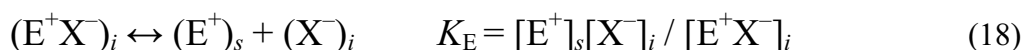
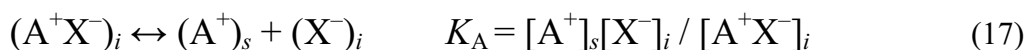
$$\frac{k_A}{k_B} = \frac{K_{SA}}{K_{SB}} \quad (16)$$

em que K_{SA} e K_{SB} têm o mesmo significado que na equação 15.

Devido à correlação existente entre as energias de solvatação dos iões e a actividade superficial dos mesmos, quer o modelo de carga residual quer o modelo de evaporação iónica predizem qualitativamente a mesma direcção para a variação dos coeficientes k , das espécies iónicas [43,45,58,73]. É de referir que as energias de solvatação livres representam, na base do modelo de evaporação iónica de Iribarne e Thomson, uma componente importante e determinante para o processo de evaporação dos iões [19,20]. Deste modo, se existe correlação entre as energias de solvatação livres e a actividade superficial das espécies analito, ambos os modelos CRM e IEM predizem qualitativamente direcções semelhantes para a variação dos coeficientes k , como fora descrito anteriormente [43,45,58,73]. Todavia, na base de comparações qualitativas dos resultados obtidos por ambos os modelos e os resultados experimentais dos coeficientes k , não é possível discriminar qual das teorias melhor se adequa com a evidência experimental.

O excesso de carga numa gota ocorre sobretudo na sua superfície, ou muito perto desta. Esta situação é, de facto, um requisito necessário para a ocorrência de repulsão de cargas mútuas nas gotas carregadas, que se traduz num fenómeno intrínseco aos eventos de explosão Coulombica e de evaporação iónica ao nível das gotas carregadas. Apesar do excesso de carga se localizar maioritariamente à superfície da gota, o interior das gotas é neutro, contendo solvente, outras moléculas, e sais. Como se pode constatar a partir do modelo IEM e do desenvolvimento do modelo proposto por Kebarle e colaboradores, tem sido prestada muita atenção aos mecanismos de solvatação dos iões e aos fenómenos relativos ao interior da gota carregada [43,45,58,73]. Todavia, na base de considerações de Kebarle e colaboradores, também foi dada alguma atenção à extensão dos modelos CRM e IEM na base do efeito da actividade superficial dos analitos [43,45,58,73]. Segundo Enke (1997), os mecanismos anteriores assentam em considerações que poderão não ser as mais críticas para a interpretação da expressão de iões na fase gasosa [82]. Tal se sucede uma vez que os iões mais afastados do seio da solução são os iões que contribuem para o excesso de

carga na superfície, ou melhor, são os iões que preferem um estado de carga na superfície da gota, ao invés de existirem na forma completamente solvatada e/ou num estado de interacção iónica, no interior da gota. Os catiões que preferem estar coordenados com aniões no interior da gota, podem de algum modo continuar a sê-lo à medida que o processo de evaporação da gota progride e até mesmo com o aumento da concentração da sua concentração em solução. Enke afirma ainda que o processo de solvatação dos iões pode não contribuir necessariamente para os fenómenos de separação de carga na gota, e consequentemente para o desenvolvimento do excesso de carga [82]. Foi na base destas considerações que Enke estabeleceu um novo modelo para interpretação dos fenómenos ocorridos na evolução das gotas carregadas na fase gasosa, que se denomina por modelo da partição de equilíbrio. O modelo proposto fora baseado na consideração do excesso de carga, como uma fase distinta do seio da gota. Assim, existe uma partição de fases na gota, que talvez se possam designar: por fase superfície e fase interior. Deste modo, se o processo de partição dos iões for suficientemente rápido, é possível assumir que a concentração relativa de iões, quer no interior quer na superfície da gota, atinja um estado de equilíbrio. Segundo Enke [82], é possível atribuir os equilíbrios de partição para os iões analito A^+ (17) e para os iões electrólito E^+ (18), bem como os coeficientes de partição envolvidos, da seguinte forma,



em que $(A^+X^-)_i$ e $(E^+X^-)_i$ representam as espécies de analito A^+ e de electrólito E^+ no interior da gota, respectivamente, $(A^+)_s$ e $(E^+)_s$ as espécies de analito e de electrólito na superfície da gota, respectivamente, $(X^-)_i$ as espécies de contra-ião no interior da gota, $[A^+]_s$ e $[E^+]_s$ são as concentrações dos iões analito e electrólito na superfície da gota, respectivamente, $[X^-]_i$ a concentração de espécies de contra-ião no interior da gota, $[A^+X^-]_i$ e $[E^+X^-]_i$ são as concentrações das espécies de analito e de electrólito no interior da gota, respectivamente, e K_A e K_E são os coeficientes dos equilíbrios de partição designados para as espécies analito e electrólito, respectivamente. É de notar que nos equilíbrios referidos (17 e 18) foram incluídas as espécies de contra-ião, uma vez que as espécies iónicas no interior da gota deverão estar completamente neutralizadas dada a

presença de uma proporção equivalente de contra-íões (X^-). Considerando um sistema de dois componentes, em que o analito A^+ e o electrólito E^+ competem para um número fixo de cargas na superfície da gota, o equilíbrio e a respectiva constante de equilíbrio são dados por:

$$(A^+X^-)_i + (E^+)_s \leftrightarrow (A^+)_s + (E^+X^-)_i$$

$$K_A / K_E = [A^+]_s [E^+X^-]_i / [A^+X^-]_i [E^+]_s \quad (19)$$

em que a simbologia e as notações envolvidas, quer no equilíbrio de partição quer na constante de equilíbrio designada, têm o mesmo significado que o enunciado para as equações 17 e 18. Enke designara a velocidade de produção do excesso de carga (eqL^{-1}) como sendo igual à corrente do circuito, I , dividida pela constante de Faraday, F [82]. Quando esta velocidade é dividida pela velocidade do fluxo da solução Γ (Ls^{-1}), tem-se como resultado a concentração do excesso de carga $[Q]$ (eqL^{-1}), existente no instante da formação da gota carregada (20) [82].

$$[Q] = I / F\Gamma \quad (20)$$

É de referir que a formação do excesso de carga, responsável por conduzir ao desenvolvimento da gota carregada, se estabelece para uma situação em que não ocorre uma evaporação significativa do solvente, pois de outro modo poderia estar-se perante uma situação em que o excesso de carga fosse originado a partir de alterações posteriores do perfil da densidade de carga na gota, e mesmo perante um evento não respeitante à formação de gotas precursoras, e como tal de gotas de outras gerações que possuam uma alteração acentuada da composição da sua fase interior, em relação ao interior das gotas iniciais formadas. Normalmente $[Q]$ assume um valor de $\sim 10^{-5} \text{ eqL}^{-1}$, reflectindo-se, portanto, no somatório das concentrações de todas as espécies carregadas na superfície da gota, ou melhor das espécies existentes em solução que contribuíram para o excesso de carga na gota, e neste caso fora considerada a contribuição de espécies analito A^+ e electrólito E^+ , de acordo com a seguinte equação,

$$[Q] = [A^+]_s + [E^+]_s \quad (21)$$

Considerando a equação 21, quando a concentração total dos catiões na gota excede $[Q]$, é possível notar a existência de competição entre os catiões para a formação do excesso de carga na superfície, e também que alguns catiões permanecerão no interior da gota, na forma neutralizada, não estando deste modo disponíveis para detecção por espectrometria de massa. Torna-se interessante mencionar que se numa situação pode existir competição entre os catiões para a formação do excesso de carga, numa outra situação a concentração dos catiões deve ser pelo menos $[Q]$, de modo a providenciar cargas suficientes para assegurar a corrente I .

Assumindo que as concentrações relativas do analito e do electrólito na superfície da gota são muito baixas, as constantes do equilíbrio de partição, na forma das equações 17 e 18, serão, ao invés:

$$K_A = [A^+]_s [X^-]_i / C_A \quad \text{e} \quad K_E = [A^+]_s [X^-]_i / C_E \quad (22)$$

em que C_A e C_E são as concentrações analíticas do analito e do electrólito, respectivamente. Resolvendo estas últimas duas equações (22) em ordem a $[X^-]_i$ e equacionando, por forma a eliminar $[X^-]_i$, tem-se a seguinte equação (23),

$$[A^+]_s = C_A K_A / C_E K_E [E^+]_s \quad (23)$$

e uma vez resolvendo a equação 18 em ordem a $[E^+]_s$ e introduzindo a equação resultante na equação 23, obtem-se a equação 24.

$$[A^+]_s = \frac{C_A K_A}{C_A K_A + C_E K_E} [Q] \quad (24)$$

Considerando que a abundância iónica é proporcional à concentração do mesmo ião no da fase superfície da gota (excesso de carga), a resposta instrumental R será dada por:

$$R_A = pf \frac{C_A K_A}{C_A K_A + C_E K_E} [Q] \quad (25)$$

em que o produto pf das constantes de proporcionalidade tem o mesmo significado que o encontrado na equação 11, segundo o modelo proposto por Tang e Kebarle [43,45,58,73]. Comparando as equações 11 e 25, verifica-se que são exactamente idênticas na sua forma, e que a fracção do excesso de carga $[Q]$ correspondente a $[A^+]_s$, na equação 25, é equivalente à fracção da corrente I conduzida pelos iões A^+ , na equação 11. A única excepção na forma das equações 11 e 25 reside no facto de na equação 11 se utilizarem coeficientes de sensibilidade k , em vez de constantes de equilíbrios de partição K , como na equação 25. A semelhança notória entre as equações 11 e 25 leva-nos a considerar que, partindo de princípios bastante diferentes, estas equações produzem respostas muito similares. Todavia, convém não esquecer que em ambas as equações os fenómenos considerados estão maioritariamente relacionados com o comportamento da solução, muito embora na equação desenvolvida por Enke (25) haja uma perspectiva de partição da fase superficial e da fase interior das gotas carregadas, embora, como referido, se considerasse a fase interior da gota na elaboração da equação 25.

Ao invés de apenas se considerar que as fracções das concentrações totais do analito e do electrólito na fase superficial gota são muito baixas, considera-se agora que iões analito e electrólito podem existir nas fases superficial e interior das gotas [82]. Deste modo, as concentrações analíticas do analito e do electrólito podem ser dadas por

$$C_A = [A^+]_s + [A^+X^-]_i \quad \text{e} \quad C_E = [E^+]_s + [E^+X^-]_i \quad (26)$$

Assim, resolvendo individualmente as equações 26 em ordem a $[A^+X^-]_i$ e a $[E^+X^-]_i$, substituindo as expressões obtidas na equação 19, e considerando também a equação 21, tem-se uma nova equação para a razão das constantes dos equilíbrios de partição, K_A/K_E (27).

$$\frac{K_A}{K_E} = \frac{[A^+]_s [E^+X^-]_i}{[A^+X^-]_i [E^+]_s} = \frac{[A^+]_s (C_E - [E^+]_s)}{(C_A - [A^+]_s) [E^+]_s} = \frac{[A^+]_s (C_E - [Q] - [A^+]_s)}{(C_A - [A^+]_s) ([Q] - [A^+]_s)} \quad (27)$$

A equação 27 contém apenas constantes e parâmetros conhecidos, como a concentração superficial de iões analito A^+ , as concentrações analíticas de A^+ e de E^+ , i.e. C_A e C_E , repectivamente, os coeficientes de partição do analito e do electrólito, K_A e K_E ,

respectivamente, e a concentração do excesso de carga na superfície $[Q]$. Interessa também referir que a equação 27 é quadrática, em relação a $[A^+]_s$, do tipo: $[A^+]_s^2 a + [A^+]_s b + c = 0$. Enke [82] resolveu a equação quadrática anterior, considerando apenas a parte da função quadrática em que C_A é menor que $[Q]$, uma vez que nesta região seleccionada a resposta dos iões analito será proporcional a C_A . Deste modo, a equação 28 corresponde à equação reduzida da equação 27. Com base na equação 28, a resposta instrumental para o ião analito A^+ é dada pela equação 29.

$$[A^+]_s = C_A \left(\frac{K_A / K_E}{K_A / K_E + C_E / [Q]} \right) \quad C_A \ll [Q] \quad (28)$$

$$R_A = pf \left(\frac{K_A / K_E}{K_A / K_E + C_E / [Q]} \right) C_A \quad (29)$$

Para baixas concentrações de analito, o excesso de carga produzido será devido às espécies electrólito em solução. Assim, depreende-se que a concentração mínima de electrólito é $[Q]$, pelo que $C_E/[Q]$ deverá ser próximo de 1. Desta forma, se C_E for igual a $[Q]$ verifica-se que o factor de resposta para o analito varia linearmente com a sua concentração analítica, com base na equação 29 (Fig. 3.8). É possível deduzir que no caso anterior o analito contribui maioritariamente para o excesso de carga na superfície. Na Fig. 3.8 está também representada a resposta do analito para diferentes valores da constante de equilíbrio de partição do analito e do electrólito, K_A/K_E [82]. Para valores de K_A/K_E maiores que a unidade, a concentração superficial do analito é praticamente idêntica à sua concentração analítica, se a concentração analítica se aproximar de $[Q]$. Ainda na Fig. 3.8, verifica-se que com a diminuição de K_A/K_E , a saturação do analito não é tão significativa, como para razões K_A/K_E elevadas [82]. Aliás, verifica-se mesmo uma anulação das regiões de baixa e de elevada concentração do analito, anteriormente determinadas por Kebarle e colaboradores [43,45,58,73], com a diminuição da razão K_A/K_E . Para valores de K_A/K_E pequenos, as espécies de electrólito em solução podem ter um contributo maior que as espécies de analito, para o excesso de carga na superfície, e daí o factor de resposta para o analito não ser uma reflexão da sua concentração analítica. Quando se aumenta a concentração do electrólito em solução acima do valor mínimo de $[Q]$, em, por exemplo, cem vezes constata-se que o factor de resposta para o

analito é menor que a unidade, mesmo quando a razão K_A/K_E assume um valor bastante elevado (Fig. 3.9) [82]. Por analogia com a Fig. 3.8, na Fig. 3.9 observa-se uma atenuação pronunciada da diferença de resposta obtida para o analito, no que respeita às regiões de baixa e de elevada concentrações do analito. É de sublinhar que com a diminuição da razão K_A/K_E , o factor de resposta para o analito diminui muito rapidamente, em comparação com as representações da Fig. 3.8. Isto deve-se ao facto da concentração total de iões em solução ser muito superior ao necessário para satisfazer $[Q]$, o que origina consequentemente que espécies com maior tendência a se acumularem na superfície o façam de forma extremamente competitiva, e com uma franca supressão das espécies com menor afinidade para a superfície. Curiosamente, na Fig. 3.9 observa-se que o factor de resposta para o analito apresenta uma relação linear em toda a gama de concentração analítica estudada, para razões K_A/K_E de 0,1 e de 0,01, o que se traduz numa extensão da região de quantificação do analito, embora com uma perda significativa da sensibilidade.

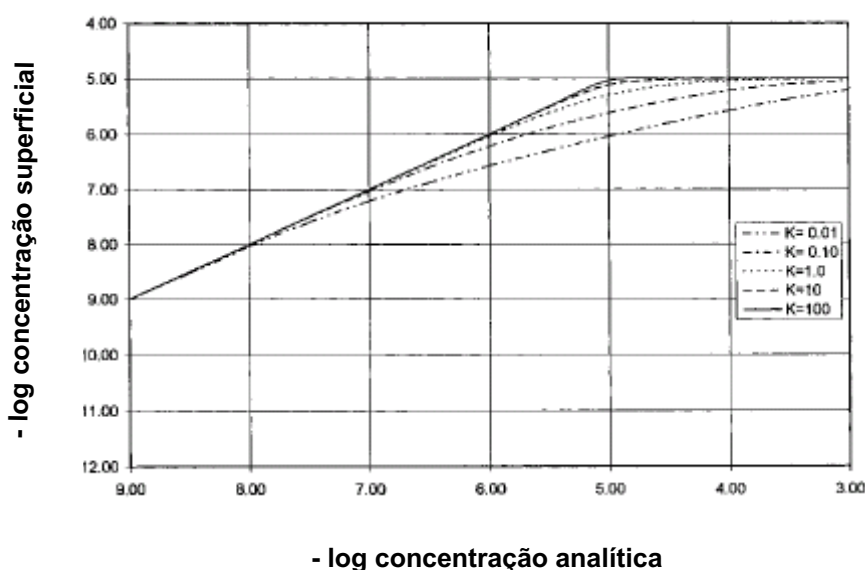


Figura 3.8. Resposta para um analito monocarregado na presença de um electrólito também monocarregado, na base da aplicação do modelo de partição de equilíbrio. $[Q] = 10^{-5}$ M; $C_E = 10^{-5}$ M; $K_A/K_E = 0,01-100$ (Ref. 82).

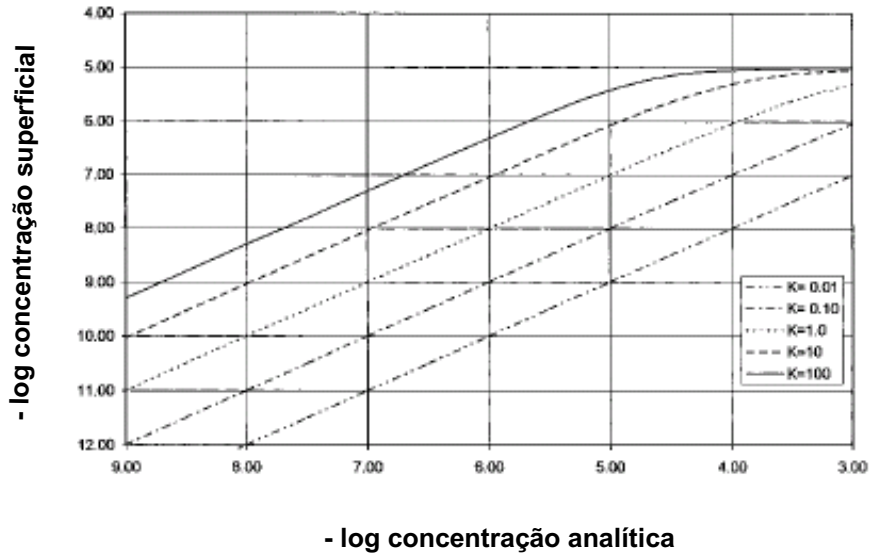


Figura 3.9. Resposta para um analito monocarregado na presença de um electrólito também mono-carregado, na base da aplicação do modelo de partição de equilíbrio. $[Q] = 10^{-5} \text{ M}$; $C_E = 10^{-3} \text{ M}$; $K_A/K_E = 0,01\text{--}100$ (Ref. 82).

Enke [82] também desenvolveu equações para um sistema de três componentes (analitos A^+ e B^+ + electrólito E^+), obtendo-se equações muito similares às obtidas para o sistema de dois componentes, anteriormente descrito segundo a perspectiva de Enke. Assim sendo, a razão das constantes de equilíbrio de partição dos analitos A^+ e B^+ , K_A/K_B , toma a seguinte forma:

$$\frac{K_A / K_E}{K_B / K_E} = \frac{K_A}{K_B} = \frac{[A^+]_S (C_B - [B^+]_S)}{(C_A - [A^+]_S) [B^+]_S} \quad (30)$$

Em que, por rearranjo da equação 30, em ordem a $[B^+]_S$, se tem a expressão 31.

$$[B^+]_S = \frac{[A^+]_S C_B}{(K_A K_B) C_A - (K_A / K_B) [A^+]_S + [A^+]_S} \quad (31)$$

Considerando uma equação, análoga à equação 21, para um sistema de três componentes, tem-se em ordem a $[E^+]_s$:

$$\begin{aligned} [E^+]_s &= [Q] - [A^+]_s - [B^+]_s \\ &= [Q] - [A^+]_s - \frac{[A^+]_s C_B}{(K_A K_B) C_A - (K_A / K_B) [A^+]_s + [A^+]_s} \end{aligned} \quad (32)$$

Resolvendo a equação 32, em ordem a $[A^+]_s$, obtém-se uma equação cúbica, do tipo: $[A^+]_s^3 a + [A^+]_s^2 b + [A^+]_s c + d = 0$. Enke [82] testara esta última equação segundo várias condições de operação, como no caso de C_A e C_B serem iguais; mantendo K_A/K_E constante a 1,0, enquanto K_B/K_E variava de 0,1 a 100. A concentração do electrólito, C_E , fora considerada igual a $[Q]$, para 10^{-5} M. Comparando as representações da Fig. 3.8 com as da Fig. 3.10, verifica-se que existe alguma semelhança nas representações, e como tal a presença de um segundo analito não deverá produzir grande efeito no factor de resposta para os analitos. Muito embora este facto, constata-se que para elevadas concentrações de analitos, em que a concentração total dos analitos na superfície começa a ser significativa em relação a $[Q]$, a presença de um segundo analito pode afectar significativamente a resposta do primeiro analito. Na Fig. 3.10a, o analito A^+ possui uma maior tendência que o analito B^+ a acumular-se na superfície [82]. Assim, o factor de resposta do analito A^+ será superior ao do analito B^+ , uma vez que a produção do excesso de carga na superfície compreende uma carga limitada. Quando os analitos possuem o mesmo valor para os coeficientes de partição, K , os analitos competem de forma igual para a produção do excesso de carga na superfície, e neste caso o valor da saturação para cada analito é de $[Q]/2$ (Fig. 3.10b) [82]. Quando o analito B^+ tem maior tendência a se acumular na superfície que o analito A^+ , o factor de resposta para o analito B^+ é superior ao determinado para o analito A^+ (Fig. 3.10c e d) [82]. Esta situação não é estranho, embora a curva de resposta do analito A^+ presente, para uma concentração analítica de $\sim 10^{-6} - 10^{-5}$ M, uma curvatura pronunciada, sendo esta tanto mais acentuada quanto maior for a tendência do analito B^+ , em relação a A^+ , para se acumular na superfície (Fig. 3.10c e d) [82]. Este efeito deve-se ao facto de nesta região de concentração ambos os analitos e o electrólito possuírem uma fracção significativa

do excesso de carga na superfície. Para concentrações baixas, o analito que possuir menor valor de K (analito menos favorecido) pode competir mais eficientemente, do que para elevadas concentrações, com o restante electrólito, em que o analito mais favorecido tem maior tendência para se acumular na superfície. Também, para sistemas de três componentes, Enke verificara que, para uma elevada concentração de electrólito em solução (de 10^{-5} para 10^{-4} M; representação da Fig. 3.10c), o factor de resposta de ambos os analitos fora minimizado a um determinado grau, que depende dos seus valores de K [82]. Curiosamente, a curvatura observada na Fig. 3.10c, desaparecera, dada a presença de uma concentração de electrólito mais elevada [82]. Este efeito pode ser facilmente explicado, tendo em conta que o analito menos favorecido não pode competir tão eficientemente com o electrólito, que apresenta agora um valor de concentração mais elevado que $[Q]$.

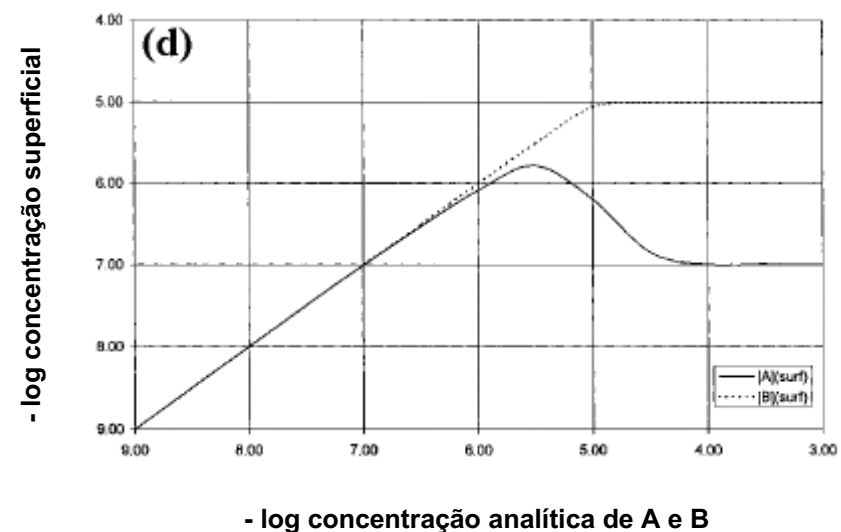
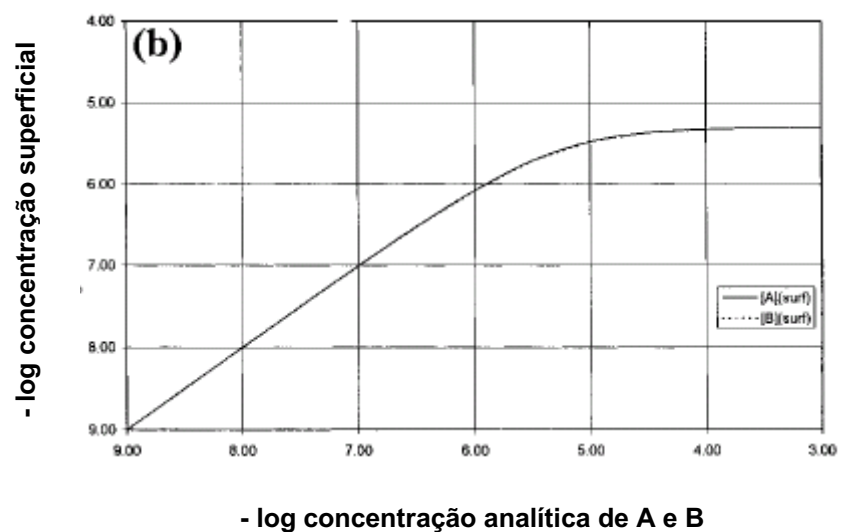
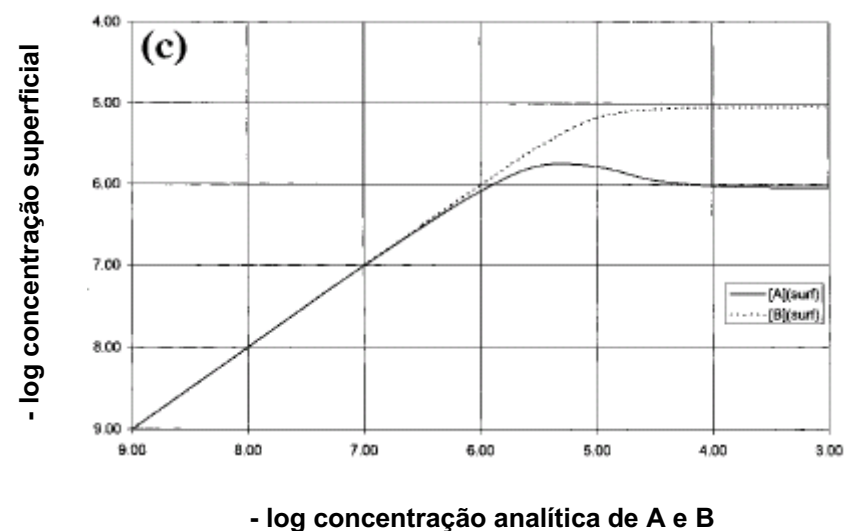
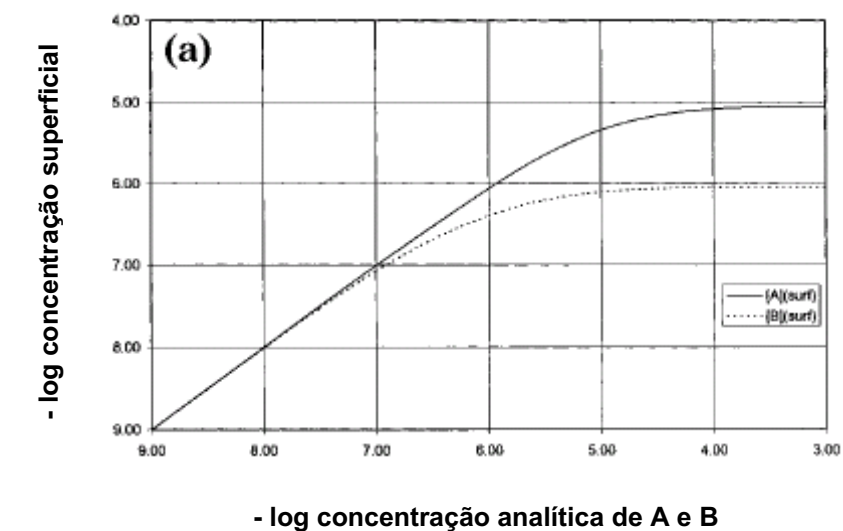


Figura 3.10. Resposta para dois analitos monocarregados, na base da aplicação do modelo de partição de equilíbrio. $[Q] = C_E = 10^{-5}$ M e $K_A/K_E = 1$. (a) $K_B/K_E = 0,1$, (b) $K_B/K_E = 1$, (c) $K_B/K_E = 10$, (d) $K_B/K_E = 100$ (Ref. 82).

De uma forma geral, pode dizer-se que o modelo de partição de equilíbrio proposto por Enke [82] explica quantitativamente muitos dos detalhes do comportamento do processo de electrospray, sobretudo no que respeita aos efeitos de analitos e de electrólitos presentes em solução, nas curvas de resposta de analitos monocarregados. A vantagem do modelo proposto reside na consideração que o processo de electrospray é iniciado pelo desenvolvimento de um excesso de carga no cone de Taylor, e que as espécies iónicas intervenientes neste excesso de carga são as que serão detectadas no espectro de massa. Querendo isto dizer que, não obstante a importância da evaporação do solvente, evaporação iónica ou explosão Coulombica, no processo de electrospray, os excessos de cargas iniciais são responsáveis pela produção de gotas carregadas ao nível de uma fase muito inicial do processo, em fases posteriores do processo, e até mesmo na produção dos excessos de cargas que se encontram intrinsecamente relacionados com alguns dos fenómenos mencionados da evolução das gotas carregadas na fase gasosa. Outro aspecto relevante do modelo de Enke [82] refere-se à ocorrência de processos de difusão nas espécies iónicas em solução, os quais parecem ser suficientemente rápidos de modo a se poderem considerar condições de equilíbrio para as espécies envolvidas.

Apesar do modelo de partição de equilíbrio enquadrar condições de operação analíticas mais eficientes quando a concentração do analito é menor que $[Q]$, e quando a concentração do electrólito se aproxima o mais possível de $[Q]$, verificou-se, segundo Constantopoulos et al. (um estudo posterior do grupo) [83], que a resposta prevista para o analito, face à aplicação do modelo de partição de equilíbrio, e a resposta instrumental obtida para o mesmo analito, eram significativamente diferentes, notando-se um aumento da resposta instrumental do ião analito com o aumento da concentração do electrólito [83]. Este efeito curioso parece, pois, contrariar as previsões do modelo de partição de equilíbrio. É de notar que neste estudo foram usados, para a determinação da resposta instrumental das espécies em solução, como analito e electrólito, os iões tetrapentilamónio (TPA^+) e sódio (Na^+), respectivamente, e metanol como solvente [83]. No mesmo estudo, os investigadores notaram que aumentando a concentração do electrólito resultara um aumento da concentração do excesso de carga $[Q]$. Por outras palavras, quando C_{TPA^+} é menor que C_{Na^+} , C_{TPA^+} não produz efeito em $[Q]$, ao passo que quando $C_{\text{TPA}^+} \geq C_{\text{Na}^+}$, $[Q]$ aumenta com C_{TPA^+} . Na verdade, é esperado um aumento de $[Q]$ com o aumento da concentração de electrólito, para uma velocidade de fluxo

constante. Esta situação é causada por um aumento da corrente do spray, dado o aumento da condutividade da solução [45]. O facto de no estudo de Constantopoulos et al., a resposta do analito, R_{TPA^+} , aumentar com o aumento da concentração do electrólito, para concentrações de electrólito até 10^{-3} M, contraria a previsão de que a resposta do analito deveria ser suprimida com o aumento da concentração de electrólito em solução.

Os resultados obtidos por Constantopoulos et al. [83] são bastante interessantes e contemplam a situação de que as espécies de analito podem não ser suprimidas, no espectro de massa ESI, na presença de quantidades significativas de electrólitos em solução. Mesmo o modelo de partição de equilíbrio de Enke [82] parece não contemplar esta situação, apesar de fornecer indicações importantes sobre o comportamento dos processos envolvidos em ESI. O aumento de R_{TPA^+} com o aumento de C_{Na^+} sugere que o modelo de partição de equilíbrio possa estar demasiado simplificado para estas condições. O modelo proposto por Enke [82] baseia-se fundamentalmente na produção de excesso de carga na superfície da gota. Deste modo, Constantopoulos et al. [83] consideram que o excesso de carga possa não só estar localizado à superfície de gota, como também no seu interior, ou melhor, os autores consideram os efeitos da força iónica em termos do desenvolvimento de uma dupla camada eléctrica. Assim, quando a solução se encontra em contacto com o eléctrodo de trabalho (agulha de electrospray), uma camada permanente de iões com carga oposta à do eléctrodo forma uma barreira entre a solução e o eléctrodo (camada compacta). A seguir a esta camada compacta, surge uma camada difusa, no sentido da solução, em que os iões podem mover-se livremente (camada difusa) [56]. Estas duas camadas constituem a dupla camada eléctrica no eléctrodo de trabalho. A fracção do excesso de carga em cada uma das camadas descritas depende, assim, da força iónica da solução. Para uma força iónica baixa (baixa concentração de sal em solução) os iões contribuintes para o excesso de carga encontram-se difundidos entre as ambas as camadas, existindo apenas uma fracção do excesso de carga na camada compacta de iões. De forma distinta, para uma elevada força iónica da solução (elevada concentração de sal) o excesso de carga formado pode estar compreendido na camada compacta. Como é de esperar, iões na camada compacta podem estar apenas parcialmente solvatados. Com a introdução do conceito de dupla camada eléctrica torna-se importante considerar a dependência da constante de partição de equilíbrio, K , da energia de solvatação dos iões e da constante de formação de iões na formação de pares iónicos, com as espécies de contra-ião em

solução [83]. Deste modo, iões com energia de solvatação positiva, para o qual é energeticamente favorável a sua desolvatação, preferem estar na superfície, onde se podem dispôr na forma parcialmente solvatada. Ao invés, iões com energias de solvatação negativas, para o qual é energeticamente favorável a manutenção da sua solvatação, preferem estar afastados da superfície, de forma a existirem na forma completamente solvatada. Assim, é possível interpretar de uma forma mais concisa o efeito da concentração do electrólito no factor de resposta do analito em ESI. Considerando que o electrólito Na^+ tem uma energia de solvatação superior à do analito TPA^+ (o analito é uma espécie mais superficialmente activa), é possível deduzir que os iões electrólito preferem estar afastados da superfície e manter a sua solvatação completa. Assim, para baixas concentrações de sal, o excesso de carga tende a ser produzido na camada difusa da gota, existindo, por conseguinte, poucos iões na camada compacta. Como uma fracção significativa do excesso de carga considera iões na sua forma solvatada, existe portanto uma redução da fracção de resposta dos iões detectados no espectrometro de massa. Neste caso, a energia de solvatação não é um factor determinante para os iões que conduzem o excesso de carga (Fig. 3.11) [83]. Aumentado a concentração de sal tem-se um aumento da fracção de iões que contribuem para o excesso de carga, na camada compacta. Nesta situação, apenas uma pequena fracção de iões se dispõe na forma solvatada, pelo que a fracção de resposta dos iões com maior energia de solvatação aumenta (Fig. 3.11). Deste modo, o efeito da dupla camada eléctrica pode explicar o aumento da fracção de resposta dos iões analito, R_{TPA^+} , com o aumento da C_{Na^+} , referido anteriormente. É ainda de acrescentar que o efeito da dupla camada eléctrica, para elevadas concentrações de sal, depende agora da energia de solvatação dos iões em solução, traduzindo-se este último, como tal, num factor com algum peso na determinação das fracções de resposta para as espécies iónicas na gota [83].

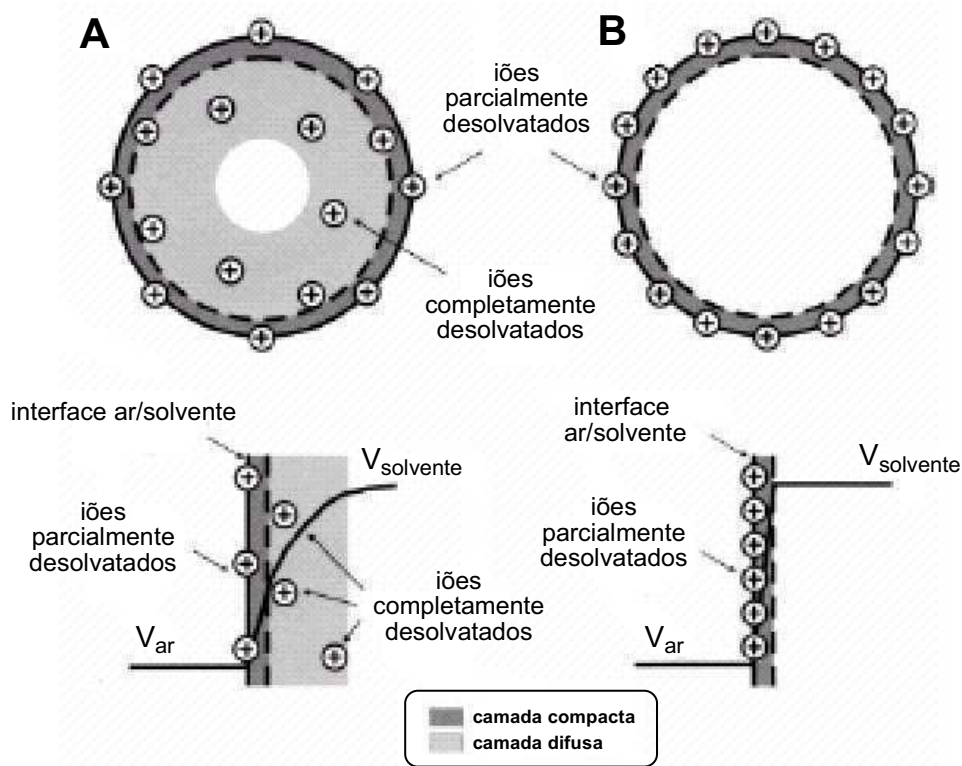


Figura 3.11. Efeito da força iónica na dupla camada eléctrica. As cargas encontram-se dispostas dentro das camadas compacta e difusa, e os perfis de pontencial na interface ar/solvente. Para baixas concentrações de sal (A), tem-se a extensão do excesso de carga para a camada difusa, na direcção ao interior da gota, deixando poucos íons na camada compacta. Para elevadas concentrações de sal (B), existe uma maior fracção do excesso de carga na camada compacta (Ref. 83).

Quando se opera na região de saturação da curva de calibração de ESI, as respostas dos analitos podem vir suprimidas. Tang e Kebarle [45,58] interpretaram o efeito de supressão para vários conjuntos de analitos, concluindo que espécies que possuam actividade superficial podem eficazmente suprimir o sinal de outras espécies que possuam uma menor ou mesmo nenhuma actividade superficial nas soluções analisadas por ESI-MS. Este fenómeno pode ser explicado pelo facto destas últimas espécies existirem numa forma mais solvatada que as primeiras espécies, esperando-se, por conseguinte, que a evaporação das últimas espécies iónicas mencionadas seja inferior à das respectivas primeiras espécies. Cech e Enke [84] verificaram que a resposta de analitos “solvofilicos” (analitos que preferem estar solvatados) pode ser drasticamente suprimida na presença de elevadas concentrações de analitos

superficialmente activos, embora a resposta de analitos superficialmente activos não seja afectada por elevadas concentrações de analitos “solvofilicos”. Constantopoulos et al. [83] verificaram que analitos superficialmente activos podem ter a sua resposta aumentada com o aumento da concentração do electrólito em solução, mesmo para concentrações de electrólito até 10^{-3} M. Este efeito fora interpretado em termos do conceito de dupla camada eléctrica, no sentido de que um aumento da concentração de sal em solução resulta num aumento da concentração do excesso de carga $[Q]$ na camada compacta, o que é indicativo da ocorrência de uma maior eficiência de ionização em ESI-MS. Bonfiglio et al. [85] deduziram que analitos superficialmente activos devem competir com analitos polares para o excesso limitado de espaço e/ou carga na superfície da gota. Assim sendo, na região de supressão da curva de calibração de ESI, analitos superficialmente activos devem suprimir a resposta de analitos mais polares.

3.3. O analisador.

O analisador é um dos componentes básicos de um espectrometro de massa. Após o processo de ionização, e num sentido lato, os iões entram numa região do espectrometro de massa, designada por analisador de massa, sendo responsável pela separação dos iões com base na sua razão massa/carga (m/z). Nos vários tipos de analisadores existentes os iões são separados por acção de campos magnético e eléctrico, e também de acordo com tempo que o ião leva a percorrer uma determinada distância até ao detector. Tal como fora referido para as fontes de ionização, os analisadores sofreram igualmente uma enorme evolução, desde os clássicos instrumentos de sector magnético. Aliás, a concepção de analisadores de massa mais simples em termos de instrumentação, e de custo mais acessível, tem sido uma preocupação de fabricantes e, em determinado aspectos, também da própria comunidade científica, sobretudo devido à extensão e ao reconhecimento da aplicabilidade das técnicas de espectrometria de massa, em campos diversificados desde as ciências biológicas e biomédicas à própria tecnologia. Esta crescente evolução dos analisadores de massa tem compreendido não só a concepção de componentes a um menor custo, como também uma evolução em termos de sensibilidade, resolução, gama de massa a analisar, entre outros aspectos. O analisador de massa mais vulgarmente utilizado em diversas técnicas de espectrometria de massa compreende o analisador de massa do tipo

quadrupolo. Isto deve-se ao facto dos instrumentos de quadrupolo serem relativamente baratos, fáceis de manusear e capazes de fornecer bom rigor na análise. Os analisadores de massa do tipo ion trap quadrupolar (QIT) têm, mais recentemente, ganho uma popularidade, significativa sobretudo devido à sua versatilidade na análise, e à sua capacidade de efectuar um variadíssimo tipo de operações analíticas, no que respeita aos recursos disponíveis na perspectiva da espectrometria de massa actual. Dada a popularidade dos instrumentos de ion trap quadrupolar, estes têm-se constituído como base para outro tipo de concepções, como o ion trap linear e o orbitrap, também estes disponíveis comercialmente. Este último instrumento (orbitrap) têm inclusivé sido objecto de alguma competição, do ponto de vista comercial, com os instrumentos de ressonância ciclotrónica de ião com transformada de Fourier.

No trabalho de investigação de que se ocupa a presente dissertação, foi utilizado um instrumento de massas do tipo ion trap quadrupolar com a incorporação de uma fonte de ionização por electrospray. Este instrumento dispõe de alguma versatilidade na análise, como a possibilidade realizar experiências de dissociação induzida por colisão (CID), e de espectrometria de massa tandem (MS^n), no que respeita à obtenção de informação estrutural e energética dos analitos detectados.

3.3.1. Analisador ion trap quadrupolar.

Em 1953, Paul e Steinwedel [86–88] trouxeram à comunidade científica a concepção do analisador ion trap quadrupolar (ou quadrupolo ion trap), que geometricamente se traduz numa armadilha adequada para o estudo de iões na fase gasosa. Nos estudos pioneiros de Paul e Steinwedel [86–88], e também de Fischer [89], a detecção de iões, no ion trap quadrupolar, era proporcionada por aplicação de técnicas de absorção por ressonância. Subsequentemente, Rettinghaus [90] usara o dispositivo para a análise de gases residuais, e Dawson e Whetten [91] conceberam primeiramente a ideia de detectar iões através da sua ejeção do ion trap. Nestes estudos iniciais do ion trap quadrupolar, o dispositivo traduzia-se como um dispositivo electrodinâmico relativamente simples para a acumulação de gases iónicos, um método de absorção de ressonância, como um dispositivo de aplicação em espectrometria de massa e como acumulador de iões para detecção e exame de iões, após a sua ejeção do ion trap. Nestes estudos iniciais sobre o ion trap quadrupolar, o dispositivo era relativamente simples, sem necessitar do uso de campo magnético, no seu modo de operação. É de notar que até ao início da década de noventa, do século XX, o interesse no dispositivo

fora mantido apenas por um número bastante limitado de investigadores. Desde a década de noventa até à actualidade, o ion trap quadrupolar tem sido alvo de um número significativo de investigações, tendo hoje uma reconhecida popularidade no seio da comunidade científica. A popularidade do ion trap quadrupolar deve-se, em boa medida, às várias alterações produzidas neste tipo de analisador, desde a concepção original de Paul e Steinwedel [86–88], como, por exemplo, o uso de uma operação de massas por estabilidade para uma operação de massas por instabilidade [92,93]. A introdução comercial dos espectrometros de massa do tipo ion trap quadrupolar teve lugar no início da década de oitenta, do século XX [94]. Estes instrumentos de massa QIT estão na actualidade totalmente computadorizados. Apesar da popularidade que hoje se conhece dos QIT, estes sofreram uma evolução significativa nos últimos 15 anos, de modo a melhorar a eficiência do dispositivo, como a introdução do gás travão [92], de hélio, controlo do tempo de trapping [95], ejeção por ressonância [96], isolamento por aplicação de voltagens de radiofrequência e de corrente contínua [97], análise MS^n [96,98,99], injeção iónica [100], extensão da gama de massas a analisar [101–103], elevada resolução [104–106], e ondas apropriadas [107–111]. Dado o facto dos analisadores ion trap quadrupolar poderem armazenar iões por um curto período de tempo, têm sido continuamente reconhecidos como dispositivos atractivos para a realização de reacções ião-molécula [112,113]. Aliás, existem concepções instrumentais que acomodam o uso de três e de quatro analisadores QIT, com o intuito de se estudarem reacções ião-molécula na fase gasosa. Também muitas fontes de ionização e *inlets* têm sido acoplados ao analisador QIT, incluindo ionização química [114,115], espectrometria de massa de iões secundários (SIMS) [100], termospray [94], descargas eléctricas [116], membrana [117], feixes de partículas [94,118], ionização/desorção laser assistida por matriz (MALDI) [119–123], ionização química à pressão atmosférica (APCI) [124], e electrospray (ESI) [125,126]. A última união (ESI com QIT), em particular, tem sido reconhecida como um instrumento analítico extremamente atractivo, no seio da comunidade científica [125,126]. Com o acoplamento da fonte de electrospray com o analisador ion trap, em particular, e de outras técnicas de ionização que requeiram a formação externa de iões antes da sua introdução no analisador, verificou-se uma intensificação de estudos relativos à injeção iónica [119,127,128], bem como o desenvolvimento de novas técnicas, com o intuito de aumentar a eficiência com que os iões são injectados no analisador ion trap [129–133].

De uma forma geral, o ion trap quadrupolar é um dispositivo bastante atractivo, uma vez que oferece uma série de vantagens, que incluem uma elevada sensibilidade, a capacidade de operar a elevadas pressões (~ 1 mTorr) em comparação com outros de analisadores de massa, e a capacidade de executar múltiplas operações, de uma forma sequencial.

Uma vez que o campo num dispositivo do tipo quadrupolo varia constantemente, a espectrometria de massa quadrupolar designada-se por *dinâmica*, enquanto que a espectrometria de massa de sector é designada por *estática*, uma vez que os parâmetros fundamentais para análise de massa (i.e. campos magnético e electrostático) num aparelho de sector não variam com o tempo, salvo necessidade de uma pequena variação para obtenção do espectro de massa [134].

Relativamente ao modo de operação de massas por instabilidade, em QIT, quando os iões entram no analisador, são rapidamente ejectados, na ordem crescente do seu valor de m/z , pois iões mais pequenos permanecem, *a priori*, menos tempo no analisador que os iões de maior tamanho. Na verdade, os iões provenientes da fonte ionização, em geral, permanecem muitíssimo pouco tempo no analisador de massa ion trap, i.e. na ordem dos microsegundos, embora uma pequena fracção destes iões ($< 5\%$) seja retida no analisador por um período de tempo superior [116,133]. No modo de operação de massas por estabilidade, os iões passam livremente sob a acção de um campo eléctrico, compreendido num determinado trajecto, em que os iões mais estáveis provavelmente serão mais bem sucedidos nesse trajecto que os iões mais instáveis. Assim, este último modo de operação baseia-se na estabilidade iónica, para análise e exame dos iões, o que acontece fundamentalmente nos analisadores de quadrupolo. Nos instrumentos de massa quadrupolo, a análise dos iões é espacial, i.e em função do espaço que os iões percorrem no analisador quadrupolo, ao passo que nos instrumentos ion trap quadrupolar a análise dos iões é temporal, ou seja, os iões são analisados em função do tempo de residência no analisador, pelo que iões com menor valor de m/z abandonam o analisador primeiro que iões com maior valor de m/z .

3.3.1.1. Características operacionais do analisador ion trap quadrupolar.

O ion trap quadrupolar (QIT) tem na sua constituição três eléctrodos (Fig. 3.12) [135–138]. Dois dos eléctrodos são designados por *end caps*, e, tal como se pode ver na Fig. 3.12, assumem posições axiais no dispositivo, enquanto que um terceiro eléctrodo, em forma de anel, eléctrodo anelar, se encontra disposto a uma distância precisa entre os

dois eléctrodos *end caps*, sendo mantendo-se esta distância por meio de espaçadores de cerâmica ou de quartzo. Os eléctrodos *end caps* são geometricamente semelhantes, distinguindo-se apenas ao nível dos orifícios existentes na sua estrutura para permitir a entrada e a saída de iões. Em regra, o eléctrodo *end cap* de entrada possui apenas um orifício, que possibilita a entrada de iões, provenientes da fonte de ionização, ao passo que o eléctrodo de saída possui vários orifícios, responsáveis pela saída dos iões do analisador para a zona do detector de massas.

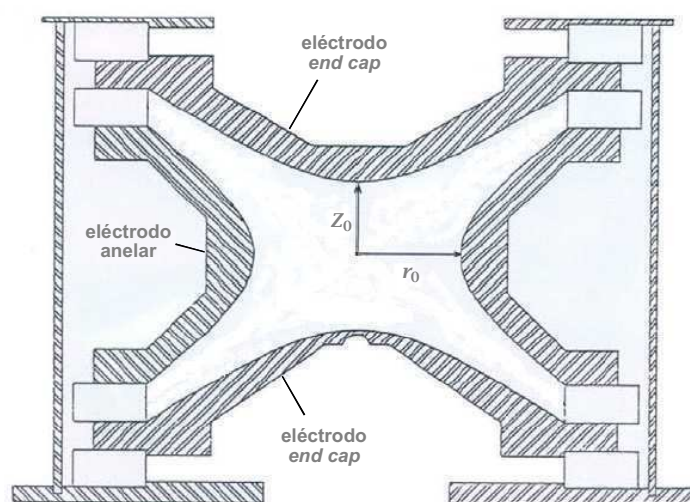


Figura 3.12. Representação esquemática de um ion trap tridimensional ideal, com a inclusão das distâncias axial (z_0) e radial (r_0) em relação ao centro do dispositivo (Ref. 135).

Aos três eléctrodos constituintes do analisador ion trap é aplicado um pequeno potencial negativo, de modo a favorecer a injeção de iões positivos, anteriormente produzidos na fonte de ionização, à excepção do caso em que a fonte de ionização corresponde a uma fonte de electrospray, em que a produção de iões na fase gasosa não é apenas restringida a processos exclusivos da fonte de ionização, mas também a processos que possam ocorrer em regiões de maior pressão que aquela em que se encontra o analisador – os fenómenos intrínsecos à produção de iões na fase gasosa estendem-se desde a fonte até ao detector. Por aplicação de uma voltagem de radiofrequência rf nos três eléctrodos que compõem o analisador de massa, tem-se a formação de um campo quadrupolar tridimensional. Este campo quadrupolar aprisiona os iões no espaço físico do analisador, forçando-os continuamente na direcção do centro do dispositivo. Deste modo, a força de um ião é linearmente proporcional à distância do ião ao centro do QIT.

O movimento de um ião de razão massa/carga, m/e^1 , no ion trap tridimensional, é dado em termos dos parâmetros a_z (33) e q_z (34) da equação diferencial de Mathieu [139],

$$a_z = -2a_r = \frac{-16eU}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (33)$$

$$q_z = -2q_r = \frac{8eV}{m(r_0^2 + 2z_0^2)\Omega^2} \quad (35)$$

Nas equações (33) e (34), r representa a direcção radial (x, y), z representa a direcção axial, U é a amplitude dc, V é a amplitude rf, e a carga sobre o ião, m a massa do ião, r_0 é o raio interior do eléctrodo anelar, z_0 é a distância axial do centro do dispositivo ao ponto mais próximo de um dos eléctrodos *end cap*, e $\Omega = 2\pi f_{rf}$, em que f_{rf} é a frequência da voltagem rf aplicada. Considerando uma geometria superficial e hiperbólica para o ion trap quadrupolar, a criação de um campo quadrupolar puro ocorre quando $r_0^2 = 2z_0^2$ (equação 35). Resolvendo a equação anterior em ordem a z_0^2 e substituindo na equações 33 e 34, tem-se uma simplificação dos parâmetros a_z (36) e q_z (37) da equação de Mathieu [139].

$$a_z = -2a_r = \frac{-8eU}{mr_0^2\Omega^2} \quad (36)$$

$$q_z = -2q_r = \frac{4eV}{mr_0^2\Omega^2} \quad (37)$$

O parâmetro a_z (que é proporcional a U , um potencial dc) pode ser ignorado, uma vez que na maioria dos instrumentos comerciais ion trap não existe a possibilidade de aplicação de um potencial dc nos eléctrodos, logo a_z é igual a zero. Assim, o modo de operação mais comum no ion trap corresponde a uma operação ao longo do eixo q_z (equação 37). Todavia, deve ser tido em conta que a equação q_z está apenas relacionada com o movimento dos iões num campo quadrupolar puro, pelo que na prática esta

¹ A carga é designada por e , dado que z representa a direcção axial.

situação nem sempre se verifica, uma vez que existem erros associados nas trajectórias previstas para os iões, sendo o movimento destes afectado pela presença de um campo quadrupolar imperfeito, por efeitos carga-espaco, e por eventos de colisões com o gás residente no dispositivo de ion trap.

No início dos anos oitenta, do século XX, investigadores da Finnigan Corporation constataram que os ion traps construídos na base da geometria específica da equação 35 apresentavam uma baixa precisão de massas [94]. Verificara-se, igualmente, que as massas atribuídas apresentavam desvios, e que os erros envolvidos eram dependentes do composto analisado. Apesar destes fenómenos não serem bem compreendidos, sugerira-se que os desvios de massas poderiam ser devidos a diferenças na distribuição radial dos iões, devido a diferentes secções de recta de colisões iónicas, à elevada pressão do gás de hélio no ion trap, e a outros efeitos, dada a presença de campos de ordem superior, causados pelas imperfeições de campo resultantes dos orifícios de entrada e de saída dos eléctrodos *end caps* [140]. Os desvios de massa foram significativamente reduzidos através do espaçamento dos eléctrodos *end caps* por um factor de $0,11z_0$ [94]. Com esta modificação da geometria do ion trap quadrupolar verificara-se uma homogeneização do campo quadrupolar próximo do centro do analisador, responsável pelo acondicionamento dos iões.

É importante referir que os analisadores ion trap nos instrumentos LCQ e GCQ não usam um espaçamento ideal entre os eléctrodos, $r_0^2 = 2z_0^2$, pelo que é necessário ter em consideração as características de dimensão z_0 , na forma das equações 33 e 34. Nos instrumentos LCQ tem-se o uso de $r_0 = 7,07$ mm e de $z_0 = 7,85$ mm, em vez do valor teórico $z_0 = 5,00$ mm [135,136]. Como base de comparação, os anteriores ion traps nos instrumentos Finnigan MAT empregavam $r_0 = 10,00$ mm e $z_0 = 7.83$ mm [136]. Na verdade, a maioria dos analisadores ion trap quadrupolar comerciais actualmente utilizados usam $r_0 = 10,00$ mm ou $r_0 = 7,07$ mm. Relativamente aos instrumentos LCQ, tem-se ainda na sua operacionalidade o emprego de uma frequência angular, $\Omega/2\pi$, de 760 kHz e de uma gama m/z de 1850 Da [136]. Em constraste com os referidos instrumentos Finnigan MAT, os instrumentos LCQ possuem, ao nível do analisador ion trap, um único orifício em cada eléctrodo *end caps*, para permitir a entrada e a saída de iões do analisador. Um instrumento do tipo LCQ foi, como se referiu anteriormente, usado no trabalho de investigação de que se ocupa a presente dissertação.

3.3.1.1.1. Regiões de estabilidade da trajectória do ião.

A operação do ion trap quadrupolar está relacionada com determinados critérios, respeitantes à estabilidade (ou instabilidade) da trajectória do ião num determinado campo, e por sua vez condicionam as condições experimentais em que o ião é armazenado no dispositivo ou pelo qual é ejectado do mesmo, para sua consequente detecção.

As coordenadas da região de estabilidade (Fig. 3.13) traduzem-se pelos parâmetros da equação de Mathieu a_z e q_z . Na Fig. 3.13 representou-se a_z em função de q_z , ao invés de a_u em função de q_u , de forma a simplificar a representação, uma vez que $u = r, z$. Ainda como se pode ver na Fig. 3.13, a fronteira de estabilidade $\beta_z = 1$ intersecta o eixo q_z , para $q_z = 0,908$. Este ponto representa o ião com razão massa/carga mais baixa que pode ser armazenado no ion trap quadrupolar.

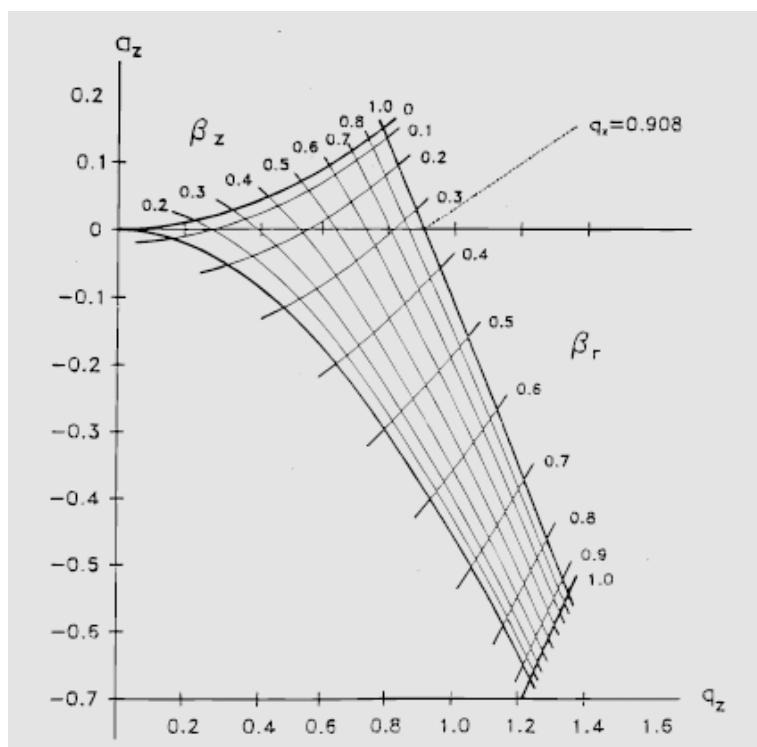


Figura 3.13. Diagrama de estabilidade no espaço (a_z, q_z) para a região de estabilidade simultânea em ambas as direcções $-r$ e $-z$ perto da origem, para o ion trap quadrupolar tridimensional; as linhas iso- β_r (duas coordenadas envolvidas) e iso- β_z encontram-se representadas no diagrama. O eixo q_z intersecta a fronteira $\beta_z = 1$ para $q_z = 0,908$, que corresponde ao $q_{\text{máx}}$ no modo de instabilidade de massas (Ref. 135).

Os pontos (a_z, q_z) representam a linha de operação ou *scan* (varrimento) no diagrama de estabilidade (Fig. 3.13), pela qual os iões passam até que sejam expelidos do ion trap. Para um *scan* básico de operação por instabilidade de massas, a linha de operação tem o seu início em $(a_z, q_z) = (0, 0)$, passando por $(a_z, q_z) = (0, 0,0908)$, sendo este último o ponto fronteira a partir do qual os iões se tornam instáveis. Como q_z é inversamente proporcional à massa (m), iões com elevada razão m/z possuem um valor baixo de q_z , em comparação com iões com baixa razão m/z . Assim, por aumento gradual da amplitude de voltagem rf aplicada no eléctrodo anelar, os iões posicionados ao longo da linha de operação, ilustrada na Fig. 3.13, movem-se para valores mais elevados de q_z . Deste modo, os iões tornam-se progressivamente mais instáveis, até que ao atingirem o valor $q_z = 0,908$, a instabilidade dos iões se promove na direcção-z, fazendo com que os iões sejam expelidos do ion trap, através dos orifícios existentes no eléctrodo *end cap* de saída. O ião com menor razão m/z torna-se instável primeiramente, seguindo-se sequencialmente outros iões por ordem crescente das suas razões m/z .

3.3.1.1.2. Frequências de ressonância dos iões.

Iões com razões m/z específicas possuem uma frequência fundamental característica para o seu movimento, podendo ser usada para promover a ressonância destes iões no analisador. Torna-se claro que se estes últimos iões têm uma razão m/z específica, possuem também um valor q_z específico. A frequência do movimento do ião na direcção-z é dada pela seguinte equação

$$f_h = (hf_{rf} \pm \beta_z f_{rf} / 2) \quad h = 0, \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots \quad (38)$$

em que f_h é o componente da frequência para o movimento do ião, f_{rf} tem o mesmo significado que nas equações 33 e 34, β_z é de um parâmetro de armazenamento, como fora constatado anteriormente, sendo um parâmetro usado para relacionar a frequência de um ião com a sua posição no diagrama de estabilidade (Fig. 3.13) [94,135]. Deste modo, β_z é dependente dos parâmetros a_z e q_z . Conhecendo o valor de q_z de um ião, é possível calcular o valor de β_z , e assim determinar as frequências de ressonância do ião, por intermédio da equação 38. Para um valor de β_z baixo, os componentes da frequência têm um efeito negligenciável no movimento do ião, a menos que sejam aplicadas voltagens mais elevadas nos eléctrodos *end caps*. De uma forma geral, a frequência de

ressonância fundamental de um ião é definida como a frequência em que $h = 0$ (i.e. $f_{z\text{-res}} = f_0 = \beta_z f_{\text{rf}}/2$). É necessário que o sinal dipolar $[V_{\text{res}} \cos(2\pi f_{z\text{-res}} t)]$ aplicado nos *end caps* seja igual à frequência de ressonância fundamental do ião, $f_{z\text{-res}}$, de modo a que seja possível utilizar a frequência de ressonância de um ião,. O recurso à frequência de ressonância fundamental de iões pode ter um impacto profundo na operação do ion trap quadrupolar, uma vez que este fenómeno pode ser utilizado para a excitação e/ou para a ejeção dos iões.

A excitação por ressonância tem sido usada com grande sucesso na extensão da gama de massas a analisar no ion trap quadrupolar.

3.3.1.1.3. Funções *Scan* e diagramas temporais.

Contrariamente aos espectrometros de massa de triplo quadrupolo, em que cada operação no feixe de iões é separada no espaço, i.e. em qualquer dos diversos quadrupolos, no ion trap quadrupolar as várias operações são separadas no tempo, embora utilizando um único analisador. A título de exemplo, para um *scan* do tipo MS-MS são realizadas várias operações, como injeção, isolamento, excitação e análise de massas, que ocorrem em períodos de tempo distintos [94] (Fig. 3.14). A função *scan* do ion trap é responsável pelo desencadear de vários processos no interior do dispositivo, que se devem fisicamente à variação de condições instrumentais, como a amplitude da voltagem rf aplicada no eléctrodo anelar, a injeção iónica, a amplitude da excitação/ejeção por ressonância, e o potencial do sistema de óptica. Assim, depreende-se que para uma determinada função *scan* no ion trap ocorre uma operação específica no interior do dispositivo, controlada por variação de condições físicas no interior e no exterior do dispositivo. Estas variações estão intrinsecamente relacionadas, com uma menor ou maior amplitude, com cada um dos processos integrados na operação que decorre no ion trap. Além da função *scan* do ion trap, directamente responsável por uma determinada análise ou exame de iões no ion trap, que contribui de uma forma directa para o resultado final obtido no espectrometro de massa, existe também a realização de um *pré-scan*, que contribui para o melhoramento da operacionalidade do analisador ion trap [94]. Deste modo, é possível assumir que o *pré-scan* precede o *scan* analítico. O *pré-scan* constitui uma operação rápida que é usada para determinar o tempo de injeção de iões mais adequado [94]. Com base na contagem de iões, medida pelo *pré-scan*, o sistema de dados calcula o tempo de injeção de iões mais adequado, de modo a que não ocorra a injeção de demasiados iões no ion

trap, o que por sua vez complicaria fortemente a análise, dada à ocorrência de efeitos de carga espacial, com consequente diminuição da resolução e da sensibilidade [94]. O *pré-scan* inclui muitos dos passos encontrados no *scan* analítico, embora o tempo de injeção iónica *pré-scan* seja relativamente mais curto em duração (≤ 10 ms) [94].

Relativamente à função *scan* no ion trap (Fig. 3.14), para uma análise MS-MS, por exemplo, a operacionalidade do ion trap compreende vários passos, como referido anteriormente; injeção iónica, isolamento, excitação e análise de massas [94]. Assim, durante o primeiro passo (passo 1), de injeção iónica, os iões são conduzidos electrostaticamente da fonte de ionização ou do *inlet* para o analisador ion trap, segundo um período de tempo determinado pelo *pré-scan*. Consequentemente, os iões são aprisionados num campo quadrupolar tridimensional, por aplicação de uma voltagem rf adequada no eléctrodo anelar. Para além do campo quadrupolar criado, os iões estão também sob a influência de uma pressão parcial de hélio (1 mTorr) no espaço físico do ion trap. Estes aspectos são importantes na medida em que fazem com que as trajetórias dos iões sejam confinadas ao centro do ion trap, inviabilizando, deste modo, a ejeção dos iões. Como se trata de uma função *scan* do tipo MS-MS, ao passo de injeção iónica, segue o passo seguinte (passo 2), de isolamento (Fig. 3.14). Neste passo, os iões precursores são seleccionados e isolados dos restantes iões. Posteriormente, segue-se o passo de excitação (passo 3) (Fig. 3.14), uma vez isolados os iões precursores de interesse, em que a excitação dos iões pode ser induzida pela ocorrência de processos ressonante e não ressonante. Por excitação não ressonante tem-se a colisão dos iões com os átomos do gás de hélio. No processo de excitação ressonante dos iões, é aplicada uma voltagem rf de excitação ressonante nos eléctrodos *end caps*, sendo esta voltagem aplicada suficientemente baixa, de modo a não provocar a ejeção dos iões do ion trap. Contudo esta voltagem altera o movimento dos iões na direcção radial $r(x, y)$, de modo a promover a energia cinética dos iões. Assim, com o aumento da energia interna dos iões seleccionados e excitados, atinge-se um limite em que ocorre dissociação dos iões, com fragmentação; previsto acontecer para ambos os processos ressonante e não ressonante. Finalmente, no último passo, de qualquer função *scan* e não apenas do tipo MS-MS, como se tem referido nesta exposição, tem-se a análise de massas (Fig. 3.14). Durante a análise de massas, os iões são ejectados sequencialmente do ion trap na direcção do detector, através de orifícios existentes no eléctrodo *end cap* de saída. Para que tal suceda, é aplicada uma voltagem rf de ejeção ressonante, de frequência fixa e de crescente amplitude, na forma de uma rampa de

voltagem rf no eléctrodo anelar, ao nível da função *scan*. Apenas serão ejectados iões quando a voltagem rf aplicada ao eléctrodo anelar está em ressonância com a voltagem rf de ejeção ressonante dos iões. Esta voltagem é aplicada mesmo antes das trajectórias dos iões se tornarem instáveis. Quando um ião entra em ressonância, move-se consequentemente para além do centro do ion trap, onde o campo criado pela aplicação da voltagem rf no eléctrodo anelar é demasiado forte, obrigando deste modo que os iões sejam sequencialmente ejectados para fora do analisador, em direcção ao ion trap. Os quatro passos mencionados, injeção iónica, isolamento, excitação, e análise de massas, ocorrem nos seguintes períodos de tempo: 0,001–1000 ms, 5–30 ms, 5–30 ms, 10–400 ms, respectivamente [94]. Verifica-se que o passo de análise de massas pode ocupar uma boa parte do tempo da função *scan*, em comparação com os restantes passos envolvidos na referida função. Uma vez finalizado o *scan*, nos seus vários passos e processos envolvidos, os dados são enviados para o sistema de dados, sendo novamente repetida a função *scan*, até que a análise em curso seja interrompida pelo operador do espectrometro de massa. Completada uma função *scan*, e os respectivos dados processados pelo sistema de dados, obtem-se o *microscan*. É usualmente necessária uma colecção de *microscans* para a obtenção de um espectro de massa, segundo uma determinada análise MS, como a aqui referida análise MS-MS.

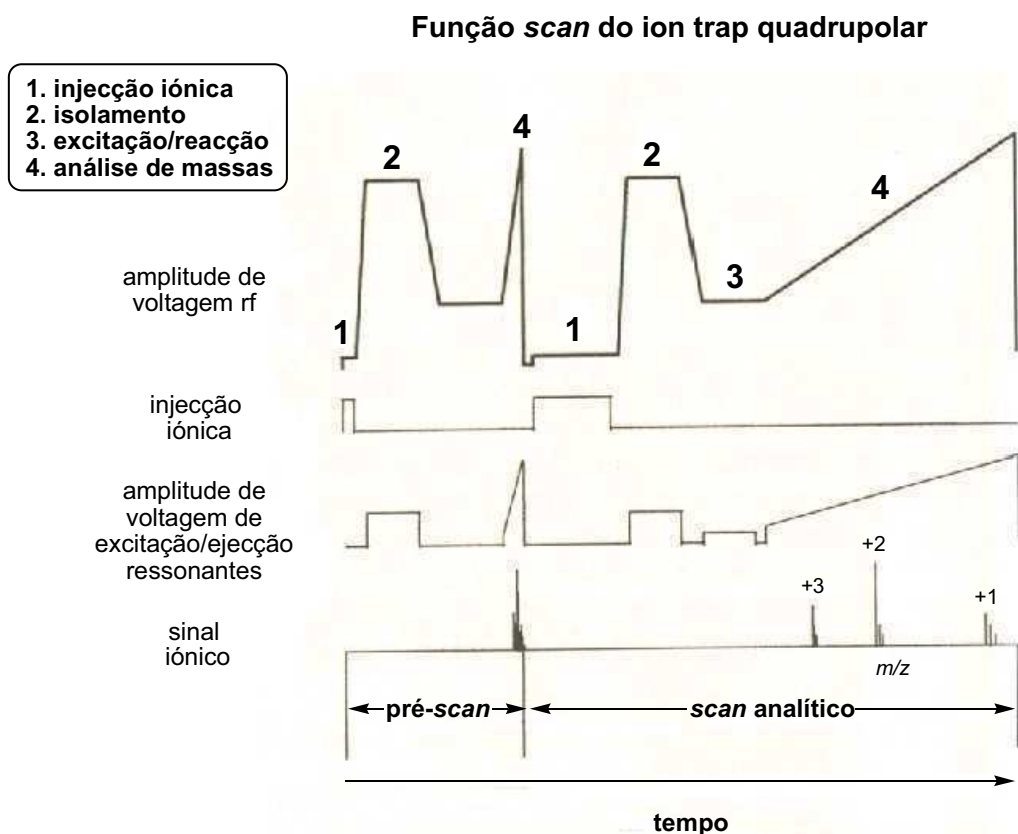


Figura 3.14. Diagrama da função *scan* simplificada do analisador ion trap quadrupolar, incluindo o *pré-scan* e o *scan* analítico, contribuindo ambos para a formação do *microscan*. Na operação do analisador ion trap quadrupolar, têm-se os passos de injeção iónica (1), isolamento (2), excitação (3), e análise de massas (4), como é possível constatar na função *scan* representada (Ref. 94).

Relativamente ao passo de excitação dos iões armazenados no ion trap, existem outros métodos adicionais para a promoção da excitação iónica no ion trap. Quando do uso de uma única frequência de excitação ressonante nos eléctrodos *end caps*, os iões fragmento resultantes da decomposição dos iões precursores excitados, não são excitados, uma vez que a frequência de ressonância destes iões é diferente da frequência de ressonância aplicada (i.e. os iões fragmento são armazenados segundo um valor diferente de β_z). A excitação de banda larga (“*broadband excitation*”), ou melhor, a excitação de iões por aplicação de uma gama de frequências, constitui uma variação do método de excitação ressonante (uso de uma frequência fixa), usado para excitar iões no ion trap (ver passo de excitação na função *scan* MS-MS). Neste caso, a gama de frequências aplicadas nos eléctrodos *end caps* excita quer os iões precursores quer os iões fragmento produzidos, no primeiro evento de dissociação. O método de excitação

por aplicação de frequências baixas também tem sido estudado ao nível da operacionalidade do ion trap. Os iões podem ser excitados por aplicação de uma frequência relativamente baixa nos eléctrodos *end caps* [94]. Este processo de excitação, ou de activação de iões, é de certo modo semelhante ao processo de colisões não ressonante numa célula de colisão múltipla, usada em instrumentos de massa do tipo triplo quadrupolo, e tem sido encarado como um processo de deposição de elevada energia nos iões. Qin e Chait aplicaram uma larga amplitude de excitação ($21 V_{p-p}$) não ressonante e observaram a fragmentação eficiente de péptidos monocarregados [94].

3.3.1.1.4. Efeitos da velocidade de *scan*.

A velocidade de *scan* ($Da s^{-1}$) é uma velocidade de ejeção dos iões para o exterior do ion trap durante o passo de análise de massas, este último incluído na função de *scan*. Em termos da operacionalidade do analisador ion trap, a velocidade de *scan* fora primeiramente aumentada pelo desenvolvimento do pré-*scan*. Posteriormente, a velocidade de *scan* fora aumentada quando da extensão da gama de massas a analisar [102]. A velocidade de *scan* constitui uma condição extremamente importante na operação do analisador de massas, pois por alteração do seu valor é possível obter efeitos benéficos nos limites de detecção (i.e. por aplicação de elevadas velocidades de *scan*) e no sinal obtido (i.e. aplicação de baixas velocidades de *scan*) [94]. Muito embora a alteração do valor da velocidade de *scan*, velocidades de *scan* muito elevadas implicam usualmente elevados aumentos na rapidez com que os iões são ejectados para o exterior do ion trap, o que pode conduzir a esbatimento dos picos desenvolvidos na gama de massas em estudo. Depreende-se também que com elevadas velocidades de *scan* o tempo de residência dos iões no ion trap é menor, o que implica que estes experimentem uma diminuição dos ciclos de ressonância antes da sua ejeção do dispositivo [94]. Se por um lado existe desvantagem no emprego de elevadas velocidades de *scan*, estas últimas fazem com que haja menos efeitos de carga espacial no analisador, o que significa que um importante número de iões possa ser armazenado e analisado sem que haja desvios de massas ou consequente deterioração da resolução de massa. Alternativamente, a diminuição da velocidade de *scan* permite que os iões armazenados no ion trap, uma vez permanecendo mais tempo no analisador, experimentem um número maior de ciclos de ressonância antes da sua ejeção, o que promove um aumento da resolução [94]. Todavia, deve-se ter em consideração que o aumento do tempo de residência dos iões no analisador pode conduzir a um aumento

dos efeitos de carga espacial, pelo que convém, neste caso, que haja uma diminuição da gama de massas a estudar [94]. Para finalizar, a aplicação de baixas ou elevadas velocidades de *scan* requer uma adequada calibração da amplitude da ejeção ressonante dos iões, em função da razão massa/carga dos iões analisados. Os efeitos menos desejados da aplicação de uma dada velocidade de *scan* são virtualmente compensados pelas condições de operacionalidade do analisador ion trap, pelo que se destaca neste contexto o papel do pré-*scan* instituído e a regulação da amplitude das frequências de ressonâncias aplicadas nos eléctrodos constituintes do analisador.

3.3.1.1.5. Efeitos carga-espço.

A ocorrência de efeitos carga-espço pode ser bastante prejudicial para a obtenção do espectro de massa. Estes efeitos devem-se à distorção do campo electrostático criado no analisador, dada a aplicação de potenciais nos eléctrodos constituintes do analisador de massa. A distorção do campo electrostático é causada pelo desenvolvimento de outros campos electrostáticos produzidos por iões, o que significa que os iões armazenados no analisador não se mantêm confinados ao centro do dispositivo, onde não estão sujeitos à acção de campos electrostáticos pronunciados. O facto de os iões não se manterem confinados nesta região central do analisador pode significar a existência de um número excessivo de iões armazenados. O excesso de iões pode fazer com que determinados iões experimentem os campos electrostáticos fortes nas imediações da região central do analisador, causando fortes perturbações no campo quadrupolar tridimensional desenvolvido, fazendo até mesmo que os iões descrevam trajetórias não ideais. Esta situação constitui a limitação fundamental que os analisadores ion trap quadrupolar apresentam, o que, por sua vez, limita a aplicabilidade de qualquer dos modelos teóricos existentes para o estudo do movimento e do comportamento dos iões armazenados em QIT. Até este ponto, não é difícil enunciar que os efeitos carga-espço sejam responsáveis pela degradação da resolução, redução da altura dos picos, e por desvios de massas para os iões analisados [141,142]. Como fora mencionado na secção anterior, o esbatimento dos picos e a redução da sua altura, até mesmo em situações que se possam confundir com a linha de base do espectro de massa, são consequências directas dos efeitos de carga-espço. Foram ainda sugeridas outras consequências físicas dos iões armazenados, dada a incidência de efeitos carga-espço, se bem que para condições mais limitativas dos referidos efeitos, como a ocorrência de deslocamento dos iões armazenados ou, até, mesmo não existir o previsto

clássico armazenamento de iões [94]. No caso do deslocamento dos iões no analisador, os iões no interior do *ion trap* podem descrever trajetórias tão irregulares, face às trajetórias ideais dos iões previstas, que ao serem ejetados do analisador podem novamente regressar a este. O deslocamento de iões deverá ocorrer por ordem descendente da razão massa/carga, baseado nas forças de armazenamento para os vários valores q_z que os iões possam tomar [94].

A prevenção da ocorrência dos referidos efeitos carga-espço é contemplada na operacionalidade do analisador *ion trap*. Deste modo, é regulado o número de iões que é permitido residência no analisador, para que apenas um 1/10 da sua capacidade seja preenchida, para a obtenção de uma análise de massas óptima [94]. A determinação da quantidade de iões introduzidos no analisador, até o limite máximo de 1/10 da sua capacidade, é estabelecida através do cálculo do tempo de injeção iónica óptimo, pelo *pré-scan* [94].

3.3.1.1.6. Efeitos do gás de hélio (gás travão).

A presença de hélio (1 mTorr) na câmara do analisador [92,93] tem a finalidade de dirigir os iões para o centro do analisador, ocupando estes iões, na base da evidência experimental, uma área não superior a 2 mm (em diâmetro) no centro do *ion trap* [143]. Dada a presença do gás de hélio no analisador, os iões diminuem a sua energia cinética (“arrefecimento” de iões), num período de tempo de poucos milissegundos, obrigando não só a que haja uma acumulação da disposição de iões no centro do *ion trap*, mas também a que quando da aplicação das voltagens rf no eléctrodo anelar, os iões possam ser ejetados em grandes conjuntos de iões, o que facilita grandemente a operacionalidade do analisador. É de referir que o processo de diminuição da energia cinética dos iões é dependente da pressão do gás de hélio existente na câmara do analisador [94]. O armazenamento de iões no analisador *ion trap*, quando provenientes de fontes externas como ESI, é extremamente dependente da pressão do gás de hélio. Assim, sem a presença do gás de hélio apenas uma fracção insignificante de iões seria armazenada no analisador. Deste modo, depreende-se que a presença de uma pressão significativa de um gás residente, como o hélio, constitui uma condição extremamente importante sobretudo para a operacionalidade do analisador *ion trap*. Com a dependência do armazenamento de iões no *ion trap*, da pressão do gás de hélio, tem-se verificado que pressões deste gás superiores a 1 mTorr aumentam a eficiência com que os iões são armazenados no analisador, embora a resolução de massa possa ser

significativamente afectada, em especial para pressões elevadas do gás residente [94]. Um aumento da pressão do gás de hélio pode conduzir ao aumento da energia interna dos iões, o que pode ainda ocasionar um aumento da sua dissociação. Apesar deste processo de excitação não ressonante ser favorecido nestas condições de operação do analisador, é muito provável que os iões experimentem uma diminuição das suas energias cinéticas, e até mesmo que os potenciais aplicados nos eléctrodos do analisador para a promoção de ejeção iónica, e de excitação, devam ser muito mais elevados, em comparação com uma situação em que a pressão do gás residente seja menor. Tipicamente, um valor óptimo para a pressão do gás de hélio no analisador ion trap oscila entre 1 e 4 mTorr [94].

3.3.2. ‘Acoplamento’ electrospray-ion trap quadrupolar.

O aspecto crítico do ‘acoplamento’ de uma fonte de electrospray a um analisador do tipo ion trap quadrupolar prende-se com o facto de que na fonte ESI o analito se encontra na fase condensada (solução) à pressão atmosférica, enquanto que o analisador ion trap funciona a uma pressão muito mais baixa. Apesar desta limitação inicial, a utilização de uma fonte de electrospray num analisador QIT teve o seu sucesso, sobretudo devido ao melhoramento da eficácia da produção de iões na fase gasosa, e como tal da operação da interface ESI e de alguns efeitos técnicos conseguidos [94]. A maioria das interfaces ESI promovem a formação de iões analito na fase gasosa através de colisões e/ou por aquecimento. Assim, a utilização de um fluxo de gás de arraste de azoto, coaxial ao aerosol produzido à saída da agulha de electrospray, favorece a evaporação das gotas carregadas produzidas, i.e por colisão com as moléculas do gás de arraste [30]. Tem sido também utilizado na fonte de electrospray um fluxo de um contra-gás de azoto, aplicado no sentido oposto ao da formação do aerosol [27]. A aplicação deste contra-gás tem como finalidade promover a dispersão do aerosol formado, auxiliando, por conseguinte, a sua vaporização. As fontes de ESI Finnigan fazem ainda uso de um tubo capilar metálico aquecido, localizado na interface do espectrometro de massa [144]. Este tubo capilar metálico aquecido, que se prolonga até à região do skimmer no espectrometro de massa ESI-QIT, auxilia na desolvatação das últimas moléculas de solvente que ainda possam persistir, antes mesmo que os iões analitos entrem nas regiões de baixa pressão. Existem ainda fontes ESI que incluem lentes aquecidas [126] para a condução dos iões, auxiliando, por conseguinte, a desolvatação dos iões analito formados. Fontes ESI que não são aquecidas, quer pela

introdução de fluxos de gases aquecidos quer pela inclusão de um capilar metálico aquecido, são responsáveis por produzir iões analito altamente solvatados, mesmo quando do seu armazenamento no analisador QIT [145]. Todavia, neste tipo de concepção instrumental, e por forma a auxiliar na desolvatação dos iões analito, o tempo de *trapping* é estendido e os iões são excitados por ressonância, de modo a aumentar os ciclos de ressonância e a promover a colisão dos iões injectados com os átomos do gás residente no analisador, antes mesmo da análise de massas. Não é de estranhar que esta última concepção instrumental ESI-QIT seja particularmente indicada para o estudo de iões complexos, fracamente coordenados, na fase gasosa [145].

Relativamente à concepção ESI-QIT desenvolvida pela Finnigan Corporation (Fig. 3.15) (concepção ESI-QIT usada experimentalmente) [94], a redução da pressão ambiente no instrumento de massa é conseguida por recurso a um sistema de vácuo, constituído por uma bomba rotatória (responsável pela produção de um pré-vácuo) e por uma bomba turbomolecular (responsável pela produção de alto vácuo) com duas entradas, de forma a assegurar as pressões de operação P_2 a P_4 nas correspondentes regiões, como se constata na Fig. 3.15 [93]. Como é possível observar na Fig. 3.15, as pressões de operação P_2 a P_4 , variam de ≈ 1 Torr, 1×10^{-3} Torr a $2,5 \times 10^{-5}$ Torr, consistente com a redução progressiva da pressão de operação do instrumento de massa desde a fonte até à região do analisador ion trap [94]. Em termos da operação do instrumento ESI-QIT, a solução em estudo é forçada a passar por um agulha de aço inoxidável (agulha de electrospray), mantida a uma voltagem de 4,5 kV (modo de ião-positivo). É produzido um aerosol que pode ser assistido por aplicação do gás de arraste, sendo seguidamente colectado por um tubo capilar metálico, mantido tipicamente a uma temperatura de 200 °C. O tubo capilar (400 μ m de diâmetro interno; 11,5 cm de comprimento) auxilia o processo de desolvatação e serve como orifício de passagem da amostra para a região seguinte, condicionada a uma menor pressão [94]. Nesta última região tem-se o posicionamento de um skimmer metálico para optimização da transmissão iónica. Os iões na região do skimmer são conduzidos pela aplicação de um potencial adequado no sistema de lentes integrado, tendo em consideração a abertura do skimmer. Assim, os iões são pulsados através do skimmer por aplicação de uma voltagem de 0 a 200 V no referido sistema de lentes, enquanto que uma voltagem de -150 V inviabiliza qualquer transmissão de iões através do skimmer [94]. Os iões conduzidos pelo sistema de lentes na região do skimmer são colectados por um primeiro octapolo rf e transmitidos a um segundo octapolo rf, por intermédio de um sistema de

lentes inter-octapolo. Os octapolos possuem um comprimento de 5 cm ($r_0 = 3,3$ cm), operando ambos por aplicação de uma voltagem rf (2,5 MHz e 400 V_{p-p}) e por uma voltagem de corrente contínua dc (usualmente -10 a +10 V) [94]. Os potenciais aplicados nos sistema de lentes de octapolos são responsáveis por conduzir os iões à região do analisador. Aliás, o segundo octapolo, do sistema de lentes, encontra-se inserido precisamente na região do analisador ion trap, i.e. no interior da entrada do eléctrodo *end cap* do QIT. O sistema de lentes de octapolos tem a finalidade de conduzir os iões de regiões de pressão relativamente elevadas, em que a dispersão iónica certamente ocorreria na sua ausência [146,147]. A minimização da dispersão de iões neste tipo de condições de operação é particularmente importante para os iões de menor massa, mesmo com a aplicação de sistemas de lentes estáticas, que não é o caso do sistema de lentes de octapolos. Para além da possibilidade das lentes de octapolos poderem transmitir iões em contínuo, podem também transmitir iões de forma diferencial. Em relação às lentes interoctapolos (diâmetro interno de 2,5 mm) [94], estas são responsáveis por (i) transmitir iões durante o período de injeção, (ii) actuar como limite de condutância para a transmissão diferencial, e (iii) actuar como barreira de potencial contra a transmissão de partículas de grandes dimensões e carregadas, formadas na fonte ESI. A presença destas partículas, que chegam inclusivé a atingir o detector, são responsáveis pela presença de picos de ruído de elevada intensidade no espectro de massa obtido. Ao nível do sistema de lentes de octapolos, a presença deste tipo de partículas de grande dimensões e carregadas pode resultar num desfasamento dos potenciais desenvolvidos nas lentes, sobretudo no que respeita à transmissão de iões de menores dimensões. Deste modo, a aplicação de um potencial positivo na ordem das centenas de volts nas lentes interoctapolos, após o período de injeção iónica, e antes do período da análise de massas, reduz eficientemente o ruído provocado pelas referidas partículas de grandes dimensões, durante o passo de análise de massas, da função *scan* [94].

Em todos os instrumentos de massa ESI-ion trap quadrupolar, os iões provenientes da fonte de electrospray são injectados axialmente através do orifício de abertura no *end cap*. Para armazenar eficientemente os iões que são injectados na forma axial no ion trap, torna-se crucial a aplicação de uma amplitude de voltagem adequada no eléctrodo anelar, e uma manutenção da pressão parcial do hélio na câmara do analisador para um mínimo de 1–2 mTorr. É de notar que os iões injectados no analisador apresentam uma elevada energia cinética, pelo que a colisão destes iões com

as moléculas do gás de hélio promove uma redução das trajectórias radiais e axiais dos iões, enquanto que o campo electrostático desenvolvido força continuamente a acumulação dos iões no centro do dispositivo, onde não existe desenvolvimento de campos electrostáticos.

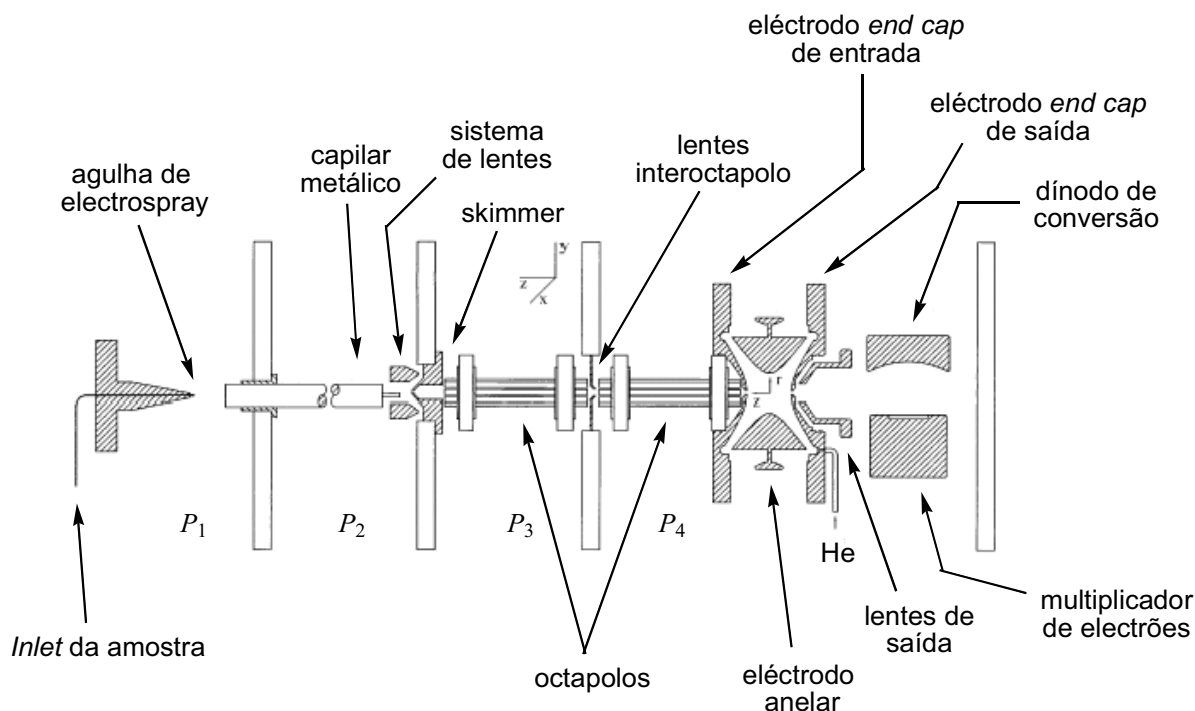


Figura 3.15. Representação esquemática de um espectrometro de massa ion trap quadrupolar equipado com uma fonte de electrospray (modelo LCQ™, desenvolvido pela Finnigan Corporation). P_1 , P_2 , P_3 e P_4 representam as pressões nas regiões do espectrometro de massa, com os respectivos valores de pressão: ≈ 760 , ≈ 1 , $\approx 1 \times 10^{-3}$ e $\approx 2,5 \times 10^{-5}$ Torr. A pressão de hélio no ion trap é de aproximadamente 10 a 20 vezes superior à pressão da região que condiciona o analisador ($P_{\text{ion trap}} \approx 1-2 \times 10^{-3}$ Torr) (Ref. 94)..

3.3.2.1. Reacções ião-molécula.

Para além dos dispositivos ion trap servirem de analisadores para espectrometria de massa, são reconhecidos há décadas como acumuladores de iões para o estudo de reacções ião-molécula [148]. Tal sucede uma vez que os iões armazenados no interior do ion trap aí podem residir por longos períodos de tempo (e.g. 10 ms ou maiores), tempo este suficiente para a ocorrência de reacções ião-molécula [148]. Estas reacções ião-molécula são dependentes da reactividade do analito, da pressão parcial do reagente neutro (e.g. água, metanol, azoto, ou analito neutro), e da duração do tempo de reacção [94]. É de notar que reacções ião-molécula não se confinam apenas a reacções que

ocorrem no analisador ion trap, uma vez que antes dos iões serem injectados no analisador os iões formados na fonte de electrospray foram expostos a pressões parciais de solventes, que podem ser significativas, como água, metanol, acetonitrilo, ou ácidos acético e trifluoroacético, na região do capilar-skimmer, sendo esta a região em que os iões formados na fonte de electrospray perdem uma grande parte ou completamente, as moléculas de solvente. Assim sendo, a ocorrência de reacções ião-molécula não constitui um evento exclusivo da operação do analisador ion trap. Todavia, é esperada uma menor reactividade das moléculas protonadas em ESI-QIT, uma vez que estes iões produzidos possuem um número par de electrões. Em geral, iões, produzidos na fonte ESI, com número par de electrões, são menos reactivos que iões com número ímpar de electrões, sendo a formação destes últimos frequente em instrumentos de massa com fonte EI [94]. A formação de iões resultantes dos processos de excitação ressonante ocorridos na câmara do analisador são igualmente pouco reactivos, devido ao facto de possuírem um número par de electrões [94]. Apesar disso, estes últimos iões podem permanecer armazenados por períodos de tempo relativamente longos, o que, por sua vez, favorece a possível ocorrência de reacções ião-molécula. Torna-se importante referir que as pressões parciais dos solventes em ESI-QIT são mais elevadas na fonte de electrospray e na região capilar-skimmer, que no interior do ion trap, neste último após injeção iónica, o que remete uma maior exposição dos iões à presença de solvente nas regiões de maior pressão do instrumento de massa ESI-QIT. A ocorrência de reacções ião-molécula é, na verdade, pouco comum em ESI-QIT. Todavia, a observação da sua ocorrência pode auxiliar na reunião de informação estrutural sobre o sistema em estudo, embora possa também facilmente dificultar a interpretação de resultados obtidos numa determinada análise, requerendo, assim, para determinados sistemas de solventes, e de analitos específicos, uma criteriosa avaliação da operação do instrumento de massas.

3.3.2.2. Detecção de iões ejectados.

O espectrometro de massa ESI-QIT utilizado no trabalho de investigação de se ocupa esta dissertação encontra-se munido de um sistema de detecção que inclui um dínodo de conversão e um multiplicador de electrões de canal. O sistema de detecção está localizado na mesma região do analisador de massa QIT, no espectrometro de massa, com uma orientação fora do eixo do analisador, evitando, assim, que moléculas neutras, ou outro tipo de espécies, colidam directamente com o dínodo de conversão ou

com o multiplicador de electrões, o que reduz consideravelmente qualquer interferência causada pelas espécies referidas (Fig. 3.15).

Como fora referido em secções anteriores, os iões são condicionados no centro do analisador ion trap, por aplicação de voltagens rf apropriadas e pela presença de uma pressão parcial do gás hélio residente, antes do desenvolvimento do modo de instabilidade iónica por ejeção ressonante. Nesta última situação, os iões são ejectados em conjuntos discretos de iões para o exterior do analisador. A injeção iónica para elevados valores de q_{z-ejec} promove um aumento da energia cinética dos iões armazenados, em que iões de menor massa são primeiramente ejectados do analisador que os iões de maior massa, fazendo até com que a energia cinética dos iões de maior tamanho atinja vários keV. Apesar dos iões adquirirem elevadas energias cinéticas na direcção axial, o dínodo de conversão, localizado fora do eixo do analisador, com um potencial aplicado de ± 15 kV, pode dirigir e focar os iões ejectados para a sua superfície, para consequente detecção [94]. Quando são usadas pressões parciais de hélio mais elevadas, os iões armazenados no analisador são mais eficientemente ejectados, e mesmo nestas condições de operação o detector pode dirigir diferencialmente os iões, por forma a que efeitos não desejados, como a dispersão dos iões, possam ter lugar na região do detector. O aumento da eficiência de conversão de iões de maior massa é mais pronunciado, em comparação com iões de menor massa.

3.4. Bibliografia.

- [1] Borman S, Dagani R, Rawls RC, Zurer PS. *Chem. & Eng. News*. 1998, 39.
- [2] Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. *Science*. 1989; **246**: 64.
- [3] Bose GM. *Recherches sur le cause et sur véritable théorie de l'électricité*, Wittenberg, 1745.
- [4] Rayleigh Lord. *Proc. Roy. Soc.* 1879; **29**: 71.
- [5] Rayleigh Lord. *Philos. Mag.* 1882; **14**: 184.
- [6] Zeleny J. *Phys. Rev.* 1914; **3**: 69.
- [7] Zeleny J. *Phys. Rev.* 1917; **10**: 1.
- [8] Chapman S. *Phys. Rev.* 1937; **52**: 184.
- [9] Chapman S. *Phys. Rev.* 1938; **54**: 520.
- [10] Chapman S. *Phys. Rev.* 1938; **52**: 528.
- [11] Vonnegut B, Neubauer RL. *J. Colloid Sci.* 1952; **7**: 616.
- [12] Vonnegut B, Neubauer RL. *J. Colloid Sci.* 1953; **8**: 551.
- [13] Drozin VG. *J. Colloid Sci.* 1955; **10**: 158.
- [14] Dole M, Mach LL, Hines RL, Mobley RC, Ferguson LD, Alice MB. *J. Chem. Phys.* 1968; **49**: 2240.
- [15] Mack LL, Kralik P, Rheude A, Dole M. *J. Chem. Phys.* 1970; **52**: 4977.
- [16] Clegg GA, Dole M. *Bipolymers*. 1971; **10**: 821.
- [17] Dole M, Cox HL Jr, Gieniec J. *Advances in chemistry series, No. 125, Polymer molecular weight methods*. Mason EA (ed.); Electrospray mass spectroscopy, Publisher 1973, cap. 7, p. 73.
- [18] Teer D, Dole M. *J. Polymer Sci.* 1975; **13**: 985.
- [19] Thomson BA, Iribarne JV. *J. Chem. Phys.* 1976; **64**: 2287.
- [20] Iribarne JV, Thomson BA. *J. Chem. Phys.* 1979; **71**: 4451.
- [21] Kebarle P, Ho Y, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 1.
- [22] Blakely CR, McAdams M, Vestal ML. *J. Chrom.* 1978; **158**: 264.
- [23] Blakely CR, Carmody JJ, Vestal ML. *Clin. Chem.* 1980; **16**: 1467.
- [24] Blakely CR, Carmody JJ, Vestal ML. *J. Am. Chem. Soc.* 1980; **102**: 5931.
- [25] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4451.
- [26] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4671.
- [27] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 675.

- [28] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. 1984; **277**: 379.
- [29] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov MV, Nikolaev VI, Shkurov VA. *Zh. Anal. Khim.* 1985; **40**: 1272.
- [30] Bruins AP, Covey JR, Henion JD. *Anal. Chem.* 1987; **59**: 2642.
- [31] Smith RD, Barinaga CJ, Udseth HR. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1948.
- [32] MylChreest IC, Hail ME. *United States Patent 5122670*, June 16, 1992.
- [33] Meng CK, Mann M, Fenn JB. *Z. Phys. D*. 1988; **10**: 361.
- [34] Hiraoka K, Fukasawa H, Matshushita F, Aizawa K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995; **9**: 1349.
- [35] Imatani K, Smith C. *Am. Lab.* 1996; **28**: 29.
- [36] Wilm M, Mann M. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1994; **136**: 167.
- [37] Wilm M, Mann M. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 1.
- [38] Gaskell SJ. *J. Mass Spectrom.* 1997; **32**: 677.
- [39] Gallagher RT, Chapman JR, Mann M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1990; **4**: 369.
- [40] Larsen BS, McEwen. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1991; **2**: 205.
- [41] Cody RB, Tamura J, Musselman BD. *Anal. Chem.* 1992; **64**: 1561.
- [42] Fenn JB. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993; **4**: 524.
- [43] van Berkel GJ, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 2.
- [44] Tang L, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 2709.
- [45] Tang L, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 3654.
- [46] Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1989.
- [47] Blades AT, Ikonomou MG, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 2109.
- [48] Pfeifer RJ, Hendricks CD. *AIAA J.* 1968; **6**: 496
- [49] Smith DPH. *IEEE Trans. Ind. Appl.* 1986; **1A-22**: 527.
- [50] Hayati I, Bailey AI, Tadros, Th. F. *J. Colloid Interface Sci.* 1987; **117**: 205.
- [51] Hayati I, Bailey AI, Tadros, Th. F. *J. Colloid Interface Sci.* 1987; **117**: 222.
- [52] Simons DS, Colby BN, Evans CA Jr. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys.* 1974; **15**: 291.
- [53] van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1098.
- [54] van Berkel GJ, Zhou F. *Anal. Chem.* 1995; **67**: 2916.

- [55] Bockris JO'M, Reddy AKN, *Modern Electrochemistry*, Plenum Press, Nova Iorque, 1973, Vol. 1.
- [56] Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical methods*, John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1980.
- [57] Štulík K, Pacáková V, *Electroanalytical measurements in flowing liquids*, Ellis Horwood, Chischester, West Sussex, Reino Unido, 1987.
- [58] Kebarle P, Tang L. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 972A–986A.
- [59] Juhasz P, Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P, em *Methods and mechanisms for producing ions from large molecules*. Standing KG, Ens W (eds.), Plenum Press, Nova Iorque, 1991, pp. 171–184.
- [60] van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL. *Anal. Chem.* 1992; **64**: 1586.
- [61] Xu X, Nolan SP, Cole RB. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 119.
- [62] van Berkel GJ, Zhou F. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 3408.
- [63] van Berkel GJ, Zhou F, Aronson JT. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1997; **162**: 55.
- [64] Cook KD. *Mass Spectrom. Rev.* 1986; **5**: 467.
- [65] de la Mora JF, Loscertales IG. *J. Fluid Mech.* 1994; **243**: 561.
- [66] Kebarle P, Peschke M. *Anal. Chim. Acta.* 2000; **406**: 11.
- [67] Gomez A, Tang K. *Phys. Fluids.* 1994; **6**: 404.
- [68] Gamero-Castaño M, de la Mora JF. *Anal. Chim. Acta.* 2000; **406**: 67.
- [69] Locertales IG, de la Mora JF. *J. Chem. Phys.* 1995; **103**: 5041.
- [70] Gamero-Castaño M, de la Mora JF. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 790.
- [71] Taflin DC, Ward TL, Davis EJ. *Langmuir.* 1989; **5**: 376.
- [72] Cech NB, Enke CG. *Anal. Chem.* 2001; **73**: 4632.
- [73] Kebarle P. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 804.
- [74] Bruins AP, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 3.
- [75] Rafaelli A, Bruins AP. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991; **5**: 269.
- [76] Hiraoka K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992; **6**: 463.
- [77] Smith RD, Wahl JH, Goodlett DR, Hofstadler JA. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 574A.
- [78] Tamaki K. *Bull Chem. Soc. Jpn.* 1967; **40**: 38.
- [79] Horming DW, Hendricks CD. *J. Appl. Phys.* 1979; **50**: 2614.
- [80] Cloupeau M, Prunet-Foch B. *J. Aerosol Sci.* 1994; **25**: 1021.
- [81] Cloupeau M. *J. Aerosol Sci.* 1994; **25**: 1143.

- [82] Enke CG. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 4885.
- [83] Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 625.
- [84] Cech NB, Enke CG. *Anal. Chem.* 2000; **72**: 2717.
- [85] Bonfiglio R, King RC, Olah TV, Merkle K. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1999; **13**: 1175.
- [86] Paul W, Steinwedel H. *Z. Naturforsch.* 1953; **8a**: 448.
- [87] Paul W, Steinwedel H. *Z. Naturforsch.* 1956; **104**: 672.
- [88] Paul W, Steinwedel H. *German Patent 944900*, 1956.
- [89] Fischer E. *Z. Phys.* 1959; **156**: 26.
- [90] Rettinghaus G. *Z. Angew. Phys.* 1967; **22**: 321.
- [91] Dawson PH, Whetten NR. *J. Vac. Sci. Technol.* 1968; **5**: 1.
- [92] Stafford GC, Kelley PE, Stephens DR. *United States Patent 4540884*, 1985.
- [93] Stafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1984; **60**: 85.
- [94] Bier ME, Schwartz JC, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 7.
- [95] Stafford GC, Taylor DM, Bradshaw SC. *United States Patent 5107109*, 1992.
- [96] Syka JEP, Lourijs JN, Kelley PE, Stafford GC, Reynolds WE. *United States Patent 4736101*, 1988.
- [97] Weber-Grabau M. *United States Patent 4818869*, 1989.
- [98] Lourijs JN, Cooks RG, Syka JEP, Kelley PE, Stafford GC, Todd JFJ. *Anal. Chem.* 1987; **59**: 1677.
- [99] Lourijs JN, Brodbelt-Lustig JS, Cooks RG, Glish GL, van Berkel GJ, McLuckey SA. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1990; **96**: 117.
- [100] Lourijs JN, Amy JW, Ridley TY, Cooks RG. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989; **88**: 97.
- [101] Kaiser RE, Cooks RG, Moss J, Hemberger PH. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989; **3**: 50.
- [102] Kaiser RE, Lourijs JN, Amy JW, Cooks RG. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1989; **3**: 225.
- [103] Kaiser RE, Cooks RG, Stafford GC, Syka JEP, Hemberger PH. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1991; **106**: 79.
- [104] Kaiser RE, *Tese de Doutorado*, 1990, Universidade de Purdue, USA.

- [105] Schwartz JC, Syka JEP, Jardine I. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1991; **2**: 198.
- [106] Londry FA, Wells GJ, March RE. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993; **7**: 43.
- [107] Kelley PE. *United States Patent 5134286*, 1992.
- [108] Kelley PE. *United States Patent 5206507*, 1993.
- [109] Hoekman DJ, Kelley PE. *United States Patent 5256875*, 1993.
- [110] Guan S, Marshall AG. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 1288.
- [111] Goeringer DE, Asano KG, McLuckey SA, Hoekman D, Stiller SW. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 313.
- [112] Brodbelt JS, Cooks RG. *Anal. Chem. Acta.* 1988; **65**: 1288.
- [113] McLuckey SA, van Berkel GJ, Glish GL. *J. Am. Chem. Soc.* 1990; **112**: 5668.
- [114] Louris JN, Syka JEP, Kelley PE. *United States Patent 4686367*, 1987.
- [115] Weber-Grabau M, Bradshaw SC, Syka JEO. *United States Patent 4771172*, 1988.
- [116] McLuckey SA, Glish GL, Asano KG. *Anal. Chim. Acta.* 1989, **225**: 25.
- [117] Lister AK, Wood KV, Cooks RG, Noon KR. *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 1989; **18**: 1063.
- [118] Bier ME, Winkler PC, Herron JR. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993; **4**: 38.
- [119] Louris JN, Amy JW, Ridley TY, Cooks RG. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989; **88**: 97.
- [120] Heller DN, Lys I, Cotter R, Uy OM. *Anal. Chem.* 1989; **61**: 1083.
- [121] Cox KA, Williams JD, Cooks RG, Kaiser RE. *Biol. Mass Spectrom.* 1992; **21**: 226.
- [122] Yates J. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993; **7**: 20.
- [123] Schwartz JC, Bier ME. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993; **7**: 27.
- [124] Taylor LCE, Singh R, Cahng SY, Johnson RL, Schwartz JS. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995; **9**: 902.
- [125] van Berkel GJ, Glish GL, McLuckey SA. *Anal. Chem.* 1990; **63**: 1284.
- [126] Mordehai AV, Hopfgartner G, Huggins TG, Henion JD. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1992; **6**: 508.
- [127] McLuckey SA, van Berkel GJ, Goeringer DE, Glish GJ. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 689A.
- [128] March RE, Todd JFJ, *Practical aspects of ion trap mass spectrometry*, CRC, Nova Iorque, 1995.
- [129] Moore RB, Gulick S. *Phys. Scripta T22*. 1988, 28.
- [130] Doroshenko VM, Cotter RJ, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1993; **7**: 822.

- [131] Eiden GC, Garrett AW, Cisper ME, Nogar NS, Hemberger PH. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1994; **136**: 119.
- [132] Weil C, Nappi M, Cleven CD, Wollnik H, Cooks RG. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1996; **10**: 742.
- [133] Qin J, Chait BT. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 2102.
- [134] Todd JFJ, March RE. *Int. J. Mass Spectrom.* 1999; **190/191**: 9.
- [135] March RE. *J. Mass Spectrom.* 1997; **32**: 351.
- [136] Quarmby ST, Yost RA. *Int. J. Mass Spectrom.* 1999; **190/191**: 81.
- [137] March RE. *Int. J. Mass Spectrom.* 2000; **200**: 285.
- [138] Hao C, March RE. *Int. J. Mass Spectrom.* 2001; **212**: 337.
- [139] Mathieu E. *J. Math. Pure Appl. (J. Liouville)* 1868; **13**: 137.
- [140] Wang Y, Franzen JJ. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1992; **112**: 167.
- [141] Cleven CD, Cox KA, Cooks RG, Bier ME. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1994; **8**: 451.
- [142] Cox KA, Cleven CD, Cooks RG. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1995; **144**: 47.
- [143] Williams JD, Cooks RG, Syka JEP, Hemberger PH, Nogar NS. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1993; **4**: 792.
- [144] Chowdhury SK, Katta V, Chait BT. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1990; **1**: 382.
- [145] McLuckey SA, van Berkel GJ, Goeringer DE, Glish GL. *Anal. Chem.* 1994; **66**: 737A.
- [146] Teloy E, Gerlich D. *Chem. Phys.* 1974; **4**: 417.
- [147] Tosi P, Fontana G, Longano S, Bassi D. *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1989; **93**: 95.
- [148] Eichelberger JW, Budde WL, Slivon LE. *Anal. Chem.* 1987; **59**: 2730.

4. Materiais e métodos.

As experiências realizadas no trabalho experimental que se apresenta nesta dissertação, podem ser discriminadas em duas frentes: experiências relacionadas com o comportamento de soluções de compostos aminoácido e amina em condições de ESI-MS e experiências relativas ao comportamento de misturas reacionais de compostos contendo grupos amina reactivos com compostos α -dicarbonilo. As primeiras experiências mencionadas tiveram por finalidade investigar o comportamento de soluções de compostos contendo grupos amina, ou de compostos estruturalmente semelhantes a estes últimos, em condições de ESI-MS, com o intuito de se verificar se existia ou não, e em caso afirmativo, estabelecer uma possível dependência da sensibilidade em ESI-MS face a parâmetros iniciais das soluções, como a concentração e natureza do analito, concentração e natureza do electrólito e pH da solução. Estas experiências visam, de facto, uma investigação pormenorizada sobre os comportamentos dos analitos em solução e na fase gasosa, e estabelecimento eventual de uma possível correlação entre estes dois comportamentos. Com uma informação detalhada do comportamento de analitos, contendo grupos amina e de outros compostos, nas condições usadas em ESI-MS, pode obter-se uma informação mais precisa e útil para o estudo das misturas reacionais, envolvendo compostos contendo grupos amina reactivos com α -dicarbonilos; assunto que ocupa uma boa parte da actividade experimental realizada neste trabalho. É de notar que na análise das misturas reacionais recorreu-se ao uso de técnicas de espectrometria de massa ESI *off-line*, uma vez que as referidas misturas reacionais não apresentavam matrizes de elevada ordem de complexidade. As misturas reacionais foram, assim, introduzidas directamente na fonte de electrospray, após uma diluição prévia, contendo estas misturas uma proporção significativa de um tampão sulfónico não volátil (HEPES). Importa referir que no estudo do comportamento dos analitos em solução, segundo em condições de ESI-MS, apenas foram estudados compostos contendo grupos amina e compostos análogos, ao invés dos compostos α -dicarbonilo, pois estes últimos são extremamente voláteis e polares, não sendo, portanto, adequados para análise por ESI-MS.

Assim, neste capítulo procede-se, para simplificação, à discriminação dos materiais e de alguns métodos envolvidos, no que respeita às experiências realizadas para o estudo do comportamento das *soluções de analitos* por ESI-MS e no que respeita às experiências de análise das *misturas reacionais* por ESI-MS.

Soluções de analitos

4.a1. Materiais.

Os aminoácidos modificados N_{α} -acetil-L-lisina (acetil-lisina) e N_{α} -acetil-L-arginina (acetil-arginina), e os aminoácidos L-histidina e L-tirosina, a aminotriazina 3-amino-1,2,4-triazina, e o sal de sódio do tampão sulfônico ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico (sal de sódio de HEPES) foram obtidos da Sigma Chemical. O composto creatinina e o solvente orgânico metanol (HPLC p.a.) foram obtidos da Merck. Na preparação das soluções tamponadas destes compostos, utilizou-se água ultra-pura e desionizada (18,2 M Ω ms), produzida num sistema Mili-Q plus. Foram usadas pastilhas sólidas de hidróxido de sódio (NaOH; Merck) e ácido clorídrico (HCl; Riedel-de Haën) na preparação de soluções concentradas de base e de ácido inorgânicos, respectivamente, para o ajuste do pH das soluções dos compostos aminoácido e amina, acima referidos.

4.a2. Preparação das soluções dos compostos aminoácido e amina.

Foram preparadas soluções de 6 compostos (N_{α} -acetil-L-lisina, L-histidina, 3-amino-1,2,4-triazina, N_{α} -acetil-L-arginina, creatinina e L-tirosina) por dissolução do sólido numa solução de tampão HEPES, previamente preparada. Foram usadas quatro soluções do tampão HEPES: 10^{-3} M a pH 7,5, 10^{-3} M a pH 5,5, 10^{-3} M a pH 3,5 e 10^{-5} M a pH 7,5. O intervalo de concentração estudado para os analitos foi o seguinte; 10^{-7} M – 5×10^{-3} M. O pH das soluções dos compostos aminoácido e amina foi medido após a análise ESI-MS, não se observando, contudo, diferenças significativas de pH face ao pH das soluções iniciais de tampão HEPES preparadas.

Misturas reacionais

4.b1. Materiais.

Os aminoácidos modificados acetil-lisina e acetil-arginina, os compostos amina guanidina, aminoguanidina e aminotriazina 3-amino-1,2,4-triazina, os compostos α -dicarbonilo glicoxal, diacetil, fenilglicoxal, 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona, 3,4-hexanodiona, o precursor do dicarbonilo metilglicoxal 1,1'-dimetilacetal do metilglicoxal, o sal de sódio do tampão sulfônico ácido 4-(2-hidroxietil)-

1-piperazinaetanosulfónico (sal de sódio de HEPES), foram obtidos da Sigma Chemical. O composto creatinina e o solvente orgânico metanol (HPLC p.a.) foram obtidos da Merck. Na preparação das soluções tamponadas destes compostos, utilizou-se água ultra-pura e desionizada (18,2 M Ω ms), produzida num sistema Mili-Q plus. Foram usadas pastilhas sólidas de hidróxido de sódio (NaOH; Merck) e ácido clorídrico (HCl; Riedel-de Haën) na preparação de soluções concentradas de base e de ácido inorgânicos, respectivamente, para o ajuste do pH das soluções iniciais dos reagentes (amina e α -dicarbonilo), e para ajuste das misturas reaccionais a temperatura controlada.

4.b2. Síntese do α -dicarbonilo metilglioxal.

De modo a evitar a influência de contaminantes existentes nas soluções comerciais de metilglioxal no estudo das misturas reaccionais deste dicarbonilo, o metilglioxal foi sintetizado por hidrólise ácido do composto metilglioxal 1,1'-dimetilacetal, obtendo-se nesta reacção um rendimento para a formação do dicarbonilo de ~ 50 % [1].

4.b3. Preparação das misturas reaccionais.

Na preparação das misturas reaccionais, as soluções dos compostos amina (acetil-lisina, acetil-arginina, guanidina e aminoguanidina) (200 mM) e α -dicarbonilo (glioxal, metilglioxal, diacetil, fenilglioxal, 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona, 3,4-hexanodiona) (200 mM) foram preparadas individualmente por dissolução do sólido ou por diluição de soluções preparadas ou de soluções comerciais dos compostos numa solução de tampão HEPES (400 mM, pH 7,5). Estas soluções foram ainda ajustadas a pH 7,5, quando necessário. Posteriormente, a 1,5 mL de uma solução tamponada de composto amina adicionou-se o mesmo volume de uma solução também tamponada de α -dicarbonilo, perfazendo um volume total de 3 mL. É de notar que as soluções individuais de composto amina e de α -dicarbonilo foram pré-incubadas à temperatura de estudo, durante um período de 15–20 minutos. Apenas e só depois se procedeu à adição da solução de α -dicarbonilo à solução de composto amina, dando assim lugar ao início da reacção. As misturas reaccionais foram incubadas à temperatura de 70 °C durante 28 dias, numa estufa com circulação corrente de ar, condicionando, por conseguinte, as misturas reaccionais ao abrigo da luz.

Interessa referir que as soluções individuais dos α -dicarbonilos 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona não foram preparadas por recurso a

soluções tamponadas exclusivamente aquosas, como se procedera para os restantes α -dicarbonilos. Ao invés, estas soluções dos dicarbonilos de maior cadeia carbonada foram preparadas recorrendo a soluções tamponadas de 60 (metanol) : 40 (água) (v/v), devido à deficiente solubilidade que estes compostos de α -dicarbonilo apresentavam em soluções tamponadas exclusivamente aquosas. É de notar igualmente que a solução tamponada do dicarbonilo metilglioxal não foi pré-incubada à temperatura de 70 °C, antes da adição da solução tamponada do composto amina, para o início da reacção. A solução em causa foi mantida em gelo e a correspondente reacção foi iniciada à temperatura ambiente, e só depois se incubou a mistura reaccional resultante à temperatura de 70 °C. Assim sendo, a monitorização do tempo de reacção para este sistema reaccional foi iniciado apenas após 30 minutos do acondicionamento da mistura reaccional na estufa, a temperatura controlada, de forma a assegurar um equilíbrio térmico aceitável para a solução.

Após iniciadas as reacções, e tendo em consideração o tempo de contagem de segurança no caso da reacção do dicarbonilo metilglioxal, foram retiradas alíquotas de 200 μ L, para determinados tempos de reacção fixos, e imediatamente acondicionadas numa arca frigorífica a -80 °C. É importante referir que se pode falar em tempo de reacção, ao invés de tempo de incubação, uma vez que os compostos amina em estudo reagem prontamente com as formas de α -dicarbonilo seleccionadas. Aliás, esta situação fora observada ao nível da análise ESI-MS, para tempo de incubação na ordem dos 5 minutos, em que se observou a presença de picos no espectro de massa ESI correspondentes a espécies que não correspondiam aos reagentes envolvidos, mas sim a produtos de reacção, como se poderá constatar nos capítulos que seguem.

Apesar das soluções individuais de composto amina e de α -dicarbonilo se encontrarem tamponadas para pH 7,5, procedeu-se quase sempre à monitorização do pH das misturas reacionais resultantes, e também a um ajuste do pH sempre que necessário. Existia, de facto, em todos os sistemas reacionais estudados, uma ligeira variação do pH, numa menor ou maior magnitude, com tendência para uma diminuição. Essas variações compreendiam-se no intervalo $7,0 \leq \text{pH} \leq 8,0$, em meia unidade de pH.

4.1. Análise ESI-MS e ESI-MS².

A análise das soluções de analitos e das alíquotas das misturas reacionais por espectrometria de massa, foi realizada por recurso a um espectrómetro de massa do tipo ion trap quadrupolar, equipado com uma fonte de electrospray ESI. Este espectrómetro

de massa (modelo LCQ Duo), produzido na Finnigan Corporation, inclui-se talvez nos modelos produzidos pela Finnigan com maior sucesso comercial. Ao nível da fonte de electrospray, aplicou-se um potencial positivo de + 4,5 kV (na agulha de electrospray), trabalhando-se, por conseguinte, no modo de ião-positivo. Ainda na fonte de electrospray, foi aplicado um fluxo de gás de arraste de azoto e um fluxo de contra-gás, também de azoto, de *ca.* 20–40 *psi*, dependendo do comportamento da amostra nas condições operacionais ESI-MS. O capilar metálico, localizado na zona de interface do sistema, foi mantido a uma temperatura de 220 °C e a uma voltagem de +10 V. Optou-se por um aumento da temperatura usual de 200 °C para uma temperatura de 220 °C, no capilar metálico, devido ao facto das amostras em estudo serem quase exclusivamente aquosas, o que auxilia a evaporação do solvente no processo de formação de iões na fase gasosa. A pressão na região capilar/skimmer do instrumento de massas registava um valor típico de 0,92 Torr, enquanto que a pressão base na região do analisador e do detector de massas registava um valor de $1,12 \times 10^{-5}$ Torr. Foram introduzidas directamente na fonte de electrospray amostras das soluções de analitos e das misturas reaccionais, para uma velocidade de fluxo de 5 $\mu\text{L min}^{-1}$. Relativamente às alíquotas recolhidas para as misturas reaccionais, estas foram previamente diluídas 200 vezes em água ultra-pura, antes da sua introdução na fonte de electrospray. É de referir que na diluição das amostras das misturas reaccionais se optou pelo solvente usado na preparação das mesmas, i.e. água, na medida em que o uso de solventes mais voláteis, como metanol e acetonitrilo, em particular o acetonitrilo, aumentava a complexidade da análise, conforme os resultados obtidos a partir dos espectros de massa traçados. Como fora referido acima, o modo de ião-positivo foi seleccionado para as experiências em ESI-MS, e a gama de massas a estudar compreendia-se tipicamente para iões com razão massa/carga entre 50–1000. Todavia, em determinadas situações, verificou-se ser necessário a redução da razão massa/carga de iões alvo para 50–500, sobretudo para iões com baixa razão massa/carga (i.e. $< 100 m/z$). Estas situações, embora pontuais, ficaram a dever-se apenas aos ajustes necessários na operacionalidade do instrumento de massa, quando uma importante gama de massas é seleccionada para estudo, no modo de operação *fullscan*. O espectrómetro de massa foi mantido em operação, registando três *microscans* para um tempo de máximo de injeção iónica de 50 ms (valores de referência), enquanto que o espectro de massa se baseava num conjunto de *microscans* equivalente a um tempo de operação do espectrómetro de massa de 1 minuto.

Foram realizadas experiências MS^2 sobretudo quando da análise das amostras das misturas reaccionais, para assim se poder reunir informação sobre a natureza estrutural de produtos de reacção ou de outro tipo de espécies, relacionados com sistemas reaccionais em estudo. Utilizou-se uma energia de colisão de 20–50 %, da energia de colisão disponível de ser aplicada (i.e. $5 V_{p-p}$), para excitação das espécies iónicas isoladas. A magnitude da energia de colisão aplicada era regulada pela observação do espectro de massa, até que a intensidade do pico correspondente ao ião precursor estivesse compreendida entre 1–5 %. No modo de operação MS^2 , o instrumento de massas operava para um registo de três *microscans* com um tempo de injeção iónica de 200 ms. Este tempo de injeção de 200 ms é superior ao tempo de injeção iónica permitido no modo de operação *fullscan* (i.e. de 50 ms), o que significa que no modo de operação MS^2 se tem a injeção de uma maior quantidade de iões no ion trap, ocupando provavelmente estes iões mais que 1/10 da capacidade do analisador ion trap (análise de massas óptima) [2]. Este aspecto foi discutido anteriormente, no capítulo antecedente, e de facto no modo de operação MS^2 pode ser permitida a entrada de uma quantidade de iões maior que no modo de operação *fullscan*, uma vez que a função *scan* para o primeiro modo de operação referido inclui um passo adicional, de isolamento [2]. Assim, neste passo de isolamento são seleccionados apenas os iões de interesse e ejectados todos os restantes, restaurando a ocupação óptima de iões no ion trap, para 1/10 da sua capacidade, no modo de operação MS^2 [2]. É de salientar que a corrente iónica total, observada ao nível do espectro de massa para o modo de operação MS^2 , foi superior a 5×10^{-3} M em todas as análises MS consideradas. Foram igualmente realizadas, para além das experiências MS^2 , experiências MS^n , com $n = 3$ e 4, em especial para iões precursores de elevada razão massa/carga e também no caso dos resultados obtidos no modo de operação MS^2 não terem sido conclusivos para a atribuição de uma estrutura definitiva para os iões precursores.

Nas experiências MS^n realizadas, houve, em certos casos, a necessidade de seleccionar um valor de $q_{z-excit}$ superior ao usualmente atribuído na funcionalidade do analisador ion trap, aumentando o valor de $q_{z-excit}$ de 0,25 para 0,4. A necessidade desta modificação na operacionalidade do analisador verificou-se nas experiências MS^n para iões precursores com razão massa/carga baixa (usualmente $< m/z$ 100). Sabendo que o valor q_z para um ião é inversamente proporcional à sua massa [2], a atribuição do valor de $q_{z-excit}$ de 0,25 na operacionalidade do analisador ion trap, faz com que a aplicação de frequências de ressonância para estes iões de razão massa/carga baixa não conduza à

excitação dos referidos iões, uma vez que estes deverão ainda desenvolver trajectórias estáveis, o que significa que as voltagens de frequências aplicadas não são adequadas para a excitação ressonante dos iões, com vista à sua fragmentação [2]. Assim, no caso dos iões de razão massa/carga baixa, e com a consideração do valor clássico de $q_{z\text{-excit}}$ de 0,25, verifica-se que o passo de excitação na função *scan* para o modo de operação MS^2 não produz o efeito desejado, ficando, assim, os iões a aguardar pelo passo de ejeção ressonante, onde inevitavelmente os iões são ejectados do analisador ion trap por aplicação de uma amplitude de frequências de ressonância elevada no eléctrodo anelar. Deste modo, compreende-se agora a importância da atribuição de um valor de $q_{z\text{-excit}}$ superior a 0,25, como o valor de 0,4 seleccionado, resultando, assim, na atribuição de frequências de ressonância mais adequadas para o processo de excitação ressonante dos iões. Estas frequências são pois aplicadas antes das trajectórias dos iões em causa se tornarem instáveis, permitindo que os iões experimentem ciclos de ressonância adequados e um número suficiente de colisões com o gás de hélio residente, por forma a aumentar a sua energia interna e possibilitar a sua decomposição. Um aspecto curioso nas experiências MS^2 , para os iões de razão massa/carga baixa, traduz-se no facto de, quando da atribuição do valor clássico de $q_{z\text{-excit}}$ de 0,25, o aumento gradual da energia de colisão para estes iões parecer resultar na ejeção dos iões do analisador (com base na perda de sinal do ião no espectro de massa), não se observando a produção de qualquer ião fragmento. Situação esta que não foi verificada nas experiências MS^2 realizadas, quando da atribuição de um valor de $q_{z\text{-excit}}$ superior (i.e. de 0,4), em que se observou a fragmentação dos iões precursores seleccionados. Uma explicação para esta situação pode advir do facto de o aumento da energia de colisão dos iões, quando da atribuição do valor clássico de 0,25, não reflectir o perfil energético dos iões para a ocorrência do processo de excitação ressonante, ou melhor a energia de colisão aplicada poderá não se adequar a um perfil mais favorável de excitação ressonante dos iões. Por outras palavras, se o aumento da energia de colisão não reflectir as variações energéticas dos iões, poderá mesmo acontecer que para determinadas energias de colisão aplicadas os iões possam já descrever trajectórias instáveis, o que, por sua vez, não favorece o processo de excitação ressonante dos iões, mas sim a sua ejeção para o exterior do analisador. Para finalizar, é vantajoso que as frequências de ressonância aplicadas, no passo de excitação da função *scan* para o modo de operação MS^n , sejam adequadas para as variações dos perfis energéticos dos iões. Para que tal suceda é absolutamente necessário uma selecção adequada do valor de $q_{z\text{-excit}}$ para um determinado ião, quando

do desenvolvimento do modo de instabilidade iónica. Todavia, nas experiências MS² realizadas para os iões com razão massa/carga baixa, suspeita-se que não seja apenas o valor baixo do $q_{z\text{-excit}}$ que contribua para o deficiente desenvolvimento do modo de instabilidade iónica, pois pensa-se que a estabilidade dos iões precursores seleccionados pode também contribuir significativamente para essa ocorrência. Na verdade, estes iões de razão massa/carga baixa compreendem sobretudo moléculas protonadas de aminotriazina (reações da aminoguanidina com α -dicarbonilos), como posteriormente se constataria, na análise MSⁿ considerada. Sabendo que estas espécies moleculares são extremamente estáveis, não será de estranhar que não haja grande tendência para aumento da energia interna dos correspondentes iões, mesmo quando do processo de excitação ressonante dos iões, o que explica o facto dos iões aproveitarem o excesso de energia adquirido para aumentarem a sua energia cinética e abandonarem o analisador. Assim, apenas com a aplicação de frequências de ressonância mais elevadas será possível vencer algumas barreiras energéticas nos perfis energéticos dos iões precursores armazenados, com vista à sua decomposição.

Bibliografia.

- [1] Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 216.
- [2] Bier ME, Schwartz JC, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RD (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 7.

5. Comportamento de analitos com características ácido/base distintas na presença do tampão não volátil HEPES. Um estudo por ESI-MS.

O trabalho de investigação de que se ocupa esta dissertação respeita ao estudo da reactividade de compostos amina reactivos, incluindo aminoácidos modificados e compostos amina relacionados, com compostos α -dicarbonilo. Uma vez que as reacções dos compostos referidos não apresentam um grande nível de complexidade, e tendo em consideração que os reagentes, em particular os compostos contendo grupos amina livres, e os esperados produtos de reacção são compostos polares e não voláteis, optou-se pelo recurso a técnicas de espectrometria de massa de electrospray (ESI-MS) para o estudo das referidas reacções. Com base na consideração de que ESI-MS é uma técnica de ionização suave, tem sido verificado que os analitos trazidos à fase gasosa, no espectrómetro de massa, preservam em muito o seu comportamento em solução. Nesta base, a espectrometria de massa de electrospray tem sido encarada como uma técnica analítica adequada para o estudo de variadíssimos processos de reacção em solução, quer do ponto de vista fundamental quer do ponto de vista de aplicação [1]. Todas estas constatações são representativas da potencialidade da aplicação das técnicas de espectrometria de massa ESI.

Antes de se proceder ao estudo dos sistemas de reacção dos compostos contendo grupos amina livres com os compostos α -dicarbonilo, procedeu-se a uma investigação pormenorizada sobre o comportamento de determinadas espécies de analito, segundo as condições usadas em ESI-MS. Para este efeito, foram estudadas soluções mais simples que as das misturas reacionais, i.e. soluções de dois componentes (analito + electrólito). Os analitos foram seleccionados na base da sua semelhança estrutural com os compostos amina modelo, utilizados na preparação das misturas reacionais, de modo a possuírem também características diferentes, como por exemplo a sua natureza ácido/base; o que é vantajoso quando se pretende estudar o comportamento dos analitos na fase gasosa segundo as condições usadas em ESI-MS. É de notar que não foram seleccionados compostos α -dicarbonilo, uma vez que estes compostos são bastante voláteis, não sendo portanto adequados para uma análise ESI-MS. O electrólito seleccionado é o tampão não volátil (HEPES), que possui carácter de electrólito (sal de sódio) e actividade superficial [2,3], e fora incluído nas soluções das misturas reacionais.

Assim, neste capítulo, apresenta-se um estudo sobre a dependência da sensibilidade em ESI-MS de determinados parâmetros iniciais das soluções dos analitos seleccionados, como a concentração e a natureza do analito, concentração do electrólito, e o pH da solução, com o intuito de se investigar a existência de alguma relação entre o comportamento dos analitos em solução e em fase gasosa (ESI-MS). Interessa salientar que a análise das propriedades espectrais das soluções dos analitos analisadas por ESI-MS, como as abundâncias iónicas, e sua relação com parâmetros iniciais das soluções, têm sido largamente exploradas no contexto da interpretação do mecanismo envolvido em ESI-MS [4–8]. Resultados obtidos a partir dos espectros de massa traçados parecem estar directamente em consonância com determinados modelos propostos na literatura [4–8], o que equivale dizer que a informação espectral tem também uma importante contribuição para a elucidação do mecanismo electrospray.

5.1. Objectivos.

Neste capítulo, descreve-se um estudo realizado sobre o comportamento de soluções de dois componentes (analito + electrólito), segundo as condições usadas em ESI-MS. Para tal efeito, investigou-se a dependência da sensibilidade em ESI-MS de determinados parâmetros iniciais das soluções. Assim, relacionaram-se as abundâncias iónicas dos iões analito e electrólito, observadas no espectro de massa ESI, com a concentração de analito, concentração de electrólito, e o pH da solução. De uma forma geral, pretende-se com este estudo (i) determinar uma possível relação do sinal obtido em ESI-MS, para as soluções de dois componentes analisadas, com os parâmetros iniciais das soluções, (ii) interpretar a relação determinada em (i) na base de modelos empíricos e semi-empíricos existentes na literatura [4–7], com vista ao estabelecimento de possível correlação entre os comportamentos dos analitos nas fases condensada (solução) e gasosa (ESI-MS), (iii) reunir informações sobre o comportamento dos analitos em ESI-MS, de modo a auxiliar na análise qualitativa das misturas reaccionais, bem como num possível desenvolvimento de uma análise semi-quantitativa das referidas misturas reaccionais, (iv) reunir informações sobre o mecanismo envolvido em ESI-MS, com particular ênfase para a contribuição de espécies com carácter de electrólito e superficialmente activas em solução, no processo de produção de iões na fase gasosa, (v) contribuir para uma melhor compreensão da aplicabilidade das técnicas de espectrometria de massa ESI, não apenas no âmbito informação obtida sob o ponto

de vista analítico, para os sistemas reactivos de interesse biológico e biomédico, mas também no que respeita à problemática do mecanismo electrospray.

Behaviour of analytes with different acid/base chemistry in the presence of the non-volatile HEPES buffer. An ESI-MS study.¹

ABSTRACT

Non-volatile buffers currently used in biological studies are, in general, not adequate for mass spectrometry investigation, since they most often mask analyte ion generation. In the present study, the solutions of six selected analytes, with different acid/base chemistry (ranging from strongly basic to neutral), containing low and high amounts of a non-volatile buffer (HEPES), with surface activity and an electrolyte nature, were investigated under ESI-MS conditions. For that purpose, the effect of solution parameters, namely analyte and HEPES buffer concentrations and solution pH, on ESI ion signal response, was studied. For analyte solutions with a low HEPES buffer concentration (10^{-5} M), ESI mass spectra analyte ion abundances revealed the presence of two distinct regions. This observation is in agreement with literature data, for analytes exclusively in the presence of solvent. For analytes solutions with a 10^{-3} M HEPES buffer concentration, ESI mass spectra analyte ion abundances vary linearly with analyte concentrations in solution, especially for concentrations above 10^{-5} M. Model equations, provided suitable fitting for analyte + electrolyte components ion abundances dependence on components concentration in solution. These equations suggested that the analytes studied have higher sensitivity coefficients, k , than the HEPES buffer, and also that the relative efficiency, with respect to the HEPES buffer, with which these analytes are converted to gas-phase ions, increases when analyte solutions with high HEPES buffer concentration are electrosprayed. To reinforce, the same analyte ion signal detection upper limit was observed, when analyte solutions,

¹ Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* (submetido).

with either low or high HEPES buffer concentrations, were electrosprayed. The improvement of analytes ionization, especially for high analyte concentrations in solution, when high amounts of HEPES buffer are present, was discussed mechanistically, in terms of the electrospray ionization process. This study may contribute to reinforce the importance of using electrolytes and surfactants in ESI mass spectrometry.

KEYWORDS: electrospray ionization mass spectrometry; surfactant; electrolyte; HEPES buffer; amino acids.

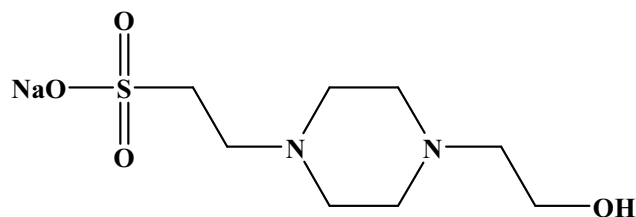
INTRODUCTION

Electrospray mass spectrometry (ESI-MS) is a technique of the greatest importance in terms of analytical chemistry and the method of choice to study chemical and biochemical processes.¹ In this work we have studied the reactions of basic amine compounds with α -dicarbonyls, using off-line electrospray ionization mass spectrometry techniques.²⁻⁴ Soon it was observed that the HEPES buffer compound (non-volatile buffer) had, in these reactions, some effect on the ionization of the analyte species, especially when high concentrations of this buffer are used (*ca.* 10^{-3} M). The HEPES buffer possesses a recognized surface activity^{5,6} and electrolyte nature (sodium salt). This behaviour prompted us to investigate in detail, under ESI-MS conditions, the effect of the HEPES buffer compound (coanalyte) on the ionization of physiologically relevant analyte species with different acid/base chemistry. HEPES is a biological buffer,⁷ commonly used to control analyte solutions at physiological pH ($pK_a = 7.55$, in water). HEPES molecules are zwitterionic, similar to amino acid molecules, especially the weakly acidic/basic and neutral ones. In addition, zwitterionic buffers which display surface activity, may influence the ionization of analytes, under ESI-MS conditions, and therefore can contribute to highlight some particular aspects of the electrospray process. It is to bear that non-volatile surfactants, in particular, when added to analyte solutions, are found to affect the ionization of analytes, often leading to suppression of the corresponding analyte ion signals, in the ESI mass spectra.^{8,9} Nevertheless, it has been observed that when non-volatile surfactants are added to analyte solutions in very low concentrations, namely 0.1 to 0.01 % (w/v), they improve the ESI analyte ion signals.⁸ These concentrations are, however, below the critical micelle concentration (cmc), and the surfactant effects are reasonably explained by an aerosol ionic redistribution (AIR) model.¹⁰⁻¹² A wide variety of anionic and cationic surfactants have been explored in this

context.^{10–12} Nevertheless, to our knowledge, no systematic investigation attempting to correlate solution parameter effects of non-volatile surfactants, such as analyte concentration, solution pH, analyte acid/base chemistry (pK_a), with ESI-MS ion signals, have been reported.

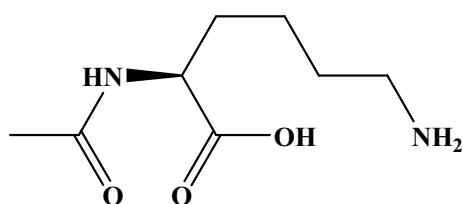
Six compounds, with different acid/base chemistry, were selected for this study with the HEPES buffer, attending to its molecular weights. The close similarity, in terms of the molecular weight, of the six compounds studied and the HEPES buffer, are important to minimize mass to charge (m/z)-dependent transmission in the mass spectrometer.¹³ A set of basic compounds [acetyl-lysine (MW 188), L-histidine (MW 155), 3-amino-1,2,4-triazine (MW 96), acetyl-arginine (MW 216) and creatinine (MW 113)], having different basicities, and one neutral amino acid (L-tyrosine) (MW 181), were selected to be studied in the presence of the specific compound (HEPES) (MW 260), in order to determine, whether, in these experiments, a relation between solution and gas phase behaviours could be observed (Fig 1).

Buffer compound

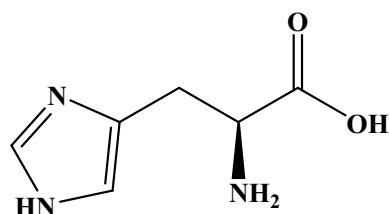


4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium salt
(HEPES sodium salt)

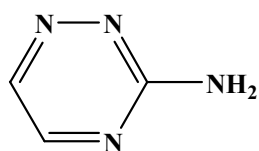
other selected compounds



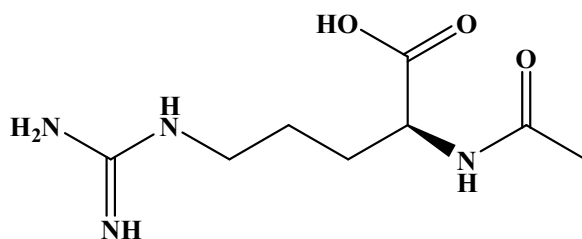
*N*_α-acetyl-L-lysine



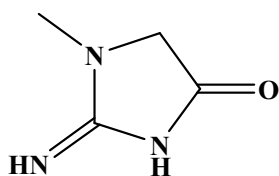
L-Histidine



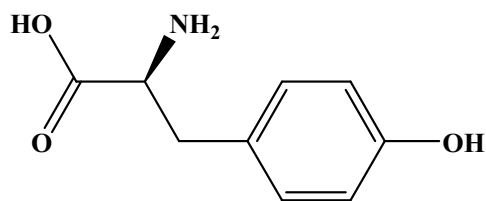
3-amino-1,2,4-triazine



*N*_α-acetyl-L-arginine



Creatinine



L-Tyrosine

Figure 1. Chemical structures of HEPES buffer and of other selected compounds.

EXPERIMENTAL

Materials

The amino acids, N_{α} -acetyl-L-lysine, L-histidine, N_{α} -acetyl-L-arginine and L-tyrosine, the aminotriazine, 3-amino-1,2,4-triazine, and the sulfonic buffer 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium salt (HEPES sodium salt), were purchased from Sigma Chemical. Creatinine and the organic solvent methanol (HPLC p.a.) were from Merck. Ultrapure deionised water (18.2 M Ω .ms) was also used in the preparation of solutions, generated in a Milli-Q plus system. Concentrated solutions of sodium hydroxide (NaOH) (solid pellets from Merck) and hydrochloric acid (HCl) (Riedel-de Haën) were employed to adjust the pH media. All chemicals used were of the highest quality available.

Preparation of solutions

Six compounds (acetyl-lysine, L-histidine, 3-amino-1,2,4-triazine, acetyl-arginine, creatinine and L-tyrosine), either basic or neutral, were used. Solutions of these six compounds were prepared by dissolving the solid in a previously prepared HEPES buffer solution. Four HEPES buffer solutions were used: 10^{-3} M at pH 7.5, 10^{-3} M at pH 5.5, 10^{-3} M at pH 3.5, and 10^{-5} M at pH 7.5. The compounds concentration range studied was: 10^{-7} M – 5×10^{-3} M. The pH of the solutions was measured after ESI-MS analysis, and no significant deviation from the initial buffered solution pH was observed.

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis were performed on an LCQ Duo ion trap mass spectrometer equipped with an ESI source. The source was maintained at a voltage of

4.5 kV, and coaxial and auxiliary gases (both nitrogen) were applied, with corresponding flow-rates of *ca.* 20–40 psi. A voltage of *ca.* 10 V and a temperature of 220 °C were applied to the capillary and maintained during the experiments. The pressure (capillary/skimmer region), measured with the convectron gauge during electrospray experiments, was normally *ca.* 0.92 torr. In the mass analyser region, the base pressure, measured with the ion gauge, was *ca.* 1.12×10^{-5} torr. The mass spectra recorded were obtained by diluting stored samples 200 times, in ultra pure water. Samples were introduced directly in the ESI source at a flow-rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mass range used, with the exception of 3-amino-1,2,4-triazine, was m/z 50 – 1000 and the positive ion mode was selected for the experiments. For 3-amino-1,2,4-triazine, the mass range studied was m/z 50 – 500, accounting for the low molecular weight of the compound (MW 96). The recorded mass spectra were based on one minute acquisition, and three microscans with a maximum ion injection time of 50 ms (default values) were used.

ESI-MS/MS analysis was performed to check if the most intense peaks, in the ESI mass spectra, indeed corresponded to the protonated molecules of the selected analytes and of the HEPES buffer compound. In these experiments, selected precursor ions were isolated in the ion trap and forced to collide with helium gas. A collision energy of 20–50 % of the maximum available collision energy was applied to the ionic species selected. The total ion current was maintained above 5×10^3 in all cases. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 200 ms (default values), and the recorded mass spectra were also based in one minute acquisition.

ESI-MS analysis of the buffered analyte solutions was performed in triplicate. ESI-MS/MS spectra were repeated two to three times. Furthermore, it was observed, in

the course of the ESI-MS analysis, that standard deviations for the protonated analyte molecule abundances ranged from 5 to 10 %. The analytes and HEPES buffer ion abundances were firstly normalized to the total ion current (TIC), and subsequently analyte ion abundances were normalized to m/z 261 buffer ion abundances.

RESULTS AND DISCUSSION

Four amino acids (acetyl-lysine, L-histidine, acetyl-arginine and L-tyrosine), one aminotriazine (3-amino-1,2,4-triazine), and one imidazolone (creatinine), having different acid/base chemistry, were studied under ESI mass spectrometric conditions, in an attempt to establish whether a relationship between solution and gas phase behaviours occurred. These compounds are relevant biological molecules in physiological processes. Furthermore, the amino acids, acetyl-arginine and acetyl-lysine, with basic side chains, are fully protonated at solution physiological pH and, therefore, their detection, according to electrospray source ionization conditions, should be favoured. Acetylation of the α -amino group, in the amino acids arginine and lysine, does not seem to change their acid/base chemistry, in comparison to non-acetylated amino acid forms. Significant chemical reactivity differences of acetylated and non-acetylated amino acids are, however, observed especially in reaction processes with electrophilic compounds involving these amino acids. The selected 3-amino-1,2,4-triazine, is believed to be a basic compound, and represents an important reaction product formed, in the reaction of the aminoguanidine pharmacological scavenger with the physiologically relevant glyoxal dicarbonyl.¹⁴ The purpose of studying this compound relies on the strong redistribution of π electron density that has been observed in the aminoguanidine molecule,¹⁵ which in turn could highlight some effect on the energetics of the aminotriazine reaction product. In other words, we intended to observe if a possible redistribution of π electron density occurring in the selected aminotriazine could result in some characteristic behaviour regarding ionization of this species under ESI-MS conditions. Moreover, in comparison to acetyl-arginine and acetyl-lysine amino acids, L-histidine and creatinine are less basic, being therefore barely protonated at media physiological pH [pKa values for L-histidine and creatinine

are: 6.1 and 4.98 (in water), respectively]. L-Tyrosine, also selected as target compound, is known to exist as a neutral molecule in solution at a physiological pH. In a wide pH range ($2.20 < \text{pH} < 9.11$), the molecules of the amino acid tyrosine exist mostly as zwitterions, rendering difficult its ionization under ESI mass spectrometry conditions. The fact that the six compounds selected represent compounds of a wide acid/base chemistry range becomes important, when supporting data are needed, and also as an attempt to obtain some insight with respect to a possible correlation of solution and gas phase behaviours, using ESI mass spectrometric experiments. Nevertheless, the selected analytes behaviour is not discussed, in this work, in terms of their acid/base chemistry, but rather in terms of the analytes ESI mass spectral behaviour, in an attempt to better describe the correlation between processes occurring in solution and in gas phase, for the analyte species studied.

Effect of analyte and HEPES buffer concentrations on ion signal response.

Firstly, we intended to examine if, and how, the ESI analyte ion signal abundance, in the mass spectra, depends on the concentration of the analyte ion in solution concentration (pH 7.5). In parallel, we intended to verify how this ion signal abundance is affected by the presence of a particular coanalyte/electrolyte (HEPES buffer). The HEPES buffer used in the experiments is the corresponding sodium salt but, for simplicity we use, throughout the text, the designation: HEPES buffer. In the literature, for a series of solutions with increasing analyte concentration, changes in the abundance of a single analyte ion in the ESI mass spectra, revealed the presence of two regions.^{16–}
¹⁹ In the first region, referred as linear dynamic range,^{16–19} the ion signal abundances vary linearly with analyte concentration enhancement in solution, normally for analyte concentrations up to $10^{-6} - 10^{-5}$ M. This region is useful for analyte ion species

quantitation in solution.^{16,17,19} In the second region, for progressively higher analyte concentrations (above 10^{-5} M), the ion signal abundance levels off and finally decreases while analyte concentration is further raised.^{16,17,19} The solvent electrolyte impurity, with a concentration of *ca.* 10^{-5} M in analyte solutions, originates an ESI ion signal which keeps constant, even when the analyte concentration in solution varies for concentrations up to $10^{-6} - 10^{-5}$ M.^{16,17,19} For analyte concentrations above this value, the electrolyte impurity ESI ion signal decreases abruptly.^{16,17,19} This was expected, because increasing the concentration of the analyte in solution leads to enhancement of analyte detection and, therefore, to suppression of the electrolyte impurity ion signal in ESI-MS. Indeed, the analyte ion species possess, in general, desorption rates higher than the solvent impurity. Moreover, it is assumed that, for analyte concentrations below 10^{-5} M, analyte ion detection under ESI conditions become possible only because of the presence of the solvent electrolyte impurity.^{16,17,19}

Fig. 2 – **A1**, **B1** and **C1** show that, for acetyl-lysine, histidine and 3-amino-1,2,4-triazine, in the presence of 10^{-3} M HEPES buffer (pH 7.5), ESI mass spectra analyte ion abundances vary linearly with the corresponding analyte concentrations in solution, especially for analyte concentrations in solution above 10^{-5} M. For analyte concentrations in solution below *ca.* 10^{-5} M (in the presence of 10^{-3} M HEPES buffer), however, analyte ion abundances appear to saturate (Fig. 2 – **A1**, **B1** and **C1**). Furthermore, it can be observed that *m/z* 261 buffer ion abundances remain almost constant, although analyte concentration in solution increases. For high analyte concentrations (above *ca.* 10^{-3} M), however, *m/z* 261 buffer ion abundances appear to slightly decrease (Fig. 2 – **A1**, **B1** and **C1**). ESI-MS analysis of analyte solutions containing the HEPES buffer with a concentration 100-times smaller (10^{-5} M) (pH 7.5), behave differently (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**). In this case, the analyte ESI mass

spectra ion abundances showed the presence of two regions, when the analyte concentration in solution is increased. In the first region, the analyte ion abundances showed a linear relationship with analyte concentrations in solution, for concentrations up to $10^{-4} - 10^{-5}$ M (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**). Above this analyte concentration range, some analyte ion abundances signal saturation in the ESI mass spectra seems to occur (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**). With respect to m/z 261 HEPES buffer ion abundances, these remained constant for analyte concentrations in solution up to *ca.* 10^{-5} M, although they decreased abruptly with increasing analyte concentration above this value (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**). Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**, which reflect the changes in the ESI mass spectra analyte and buffer ion species signals, when varying analyte concentrations in solution, are in fair agreement with literature results for ESI-MS analysis of analyte species in the presence of a solvent, solely.^{16,17,19} The changes in m/z 261 buffer ions abundances are indeed similar to the ones reported to occur for solvent electrolyte impurity species.^{16,17,19} Moreover, the concentration of the HEPES buffer (10^{-5} M) is similar to the concentration of the solvent electrolyte impurity species, in solvents such as water and methanol.^{16,17,19} The results obtained for L-tyrosine and creatinine are similar to the ones presented for the acetyl-lysine, L-histidine and 3-amino-1,2,4-triazine selected compounds.

With the determination of compounds relative sensitivities, under ESI-MS conditions, i.e. in terms of compounds relative ion abundances or compounds relative ion currents, soon mass spectrometrists interest to relate compounds ESI-MS sensitivities with compounds solution properties arises. In this context, Tang and Kebarle have proposed simple relationship equations as an attempt to describe the different relative sensitivities of ESI-MS analytes in the different concentrations ranges that are currently used experimentally.^{16,19} Equation (1a) is for a system of two

components (1a); an analyte AX which dissociates into A^+ and X^- and an electrolyte EX that dissociates into E^+ and X^- in solution.^{16,19} Equation (1b), which is similar to equation (1a), is for a three component system; analytes AX and BX that dissociate into A^+ and X^- and B^+ and X^- , respectively, and an electrolyte EX that dissociates into E^+ and X^- in solution.^{16,19} In these models, components of a particular system stand for analyte and electrolyte species present in solution. The electrolyte EX is already present in solution due to the use of buffer or, if buffers were not used, due to the presence of an impurity in the solvent used.^{16,19} This electrolyte impurity is present in solvents such as water and methanol, as mentioned above. For simplicity, the Tang and Kebarle have considered the positive ion mode, under ESI-MS conditions, and they have not specifically indicated the chemical nature of the counter ions X^- .^{16,19}

$$I_A = pf \frac{k_A[A]}{k_A[A] + k_E[E]} I \quad (\text{two components system}) \quad (1a)$$

$$I_A = pf \frac{k_A[A]}{k_A[A] + k_B[B] + k_E[E]} I \quad (\text{three components system}) \quad (1b)$$

Tang and Kebarle have found that the relative sensitivities of different analytes have a dependence on the presence and concentration of other electrolytes in the solution, as it can be seen from equations (1a) and (1b).^{16,19}

In equations (1a) and (1b), I_A is the mass spectrometrically detected ion abundance of ion A^+ , corrected for mass to charge (m/z)-dependent transmission in the mass spectrometer; $[A]$, $[B]$ and $[E]$ are the initial concentrations (mol/L) of components in the solution to be electrosprayed; I is the total electrospray current leaving the

electrospray capillary; k_A , k_B and k_E are sensitivity coefficients, which express the relative “efficiency” with which each component in the electrosprayed solution is converted to gas-phase ions; the product pf is a factor assumed to be independent on the chemical nature of ions: p is the ion-sampling efficiency, that is, the fraction of ions detected in the mass spectrometer relative to the gas-phase ions produced by the droplets at 1 atm, and f is the fraction of charges on the droplets, that are converted to gas-phase ions.^{16,19} In other words, the value of f depends on the quality of the droplets produced, while the value of p depends on the quality of the interface.¹⁷ Both p and f depend on the actual conditions, but typically p may be as high as 0.5 or even 0.8, whereas f is generally much smaller and is entirely dependent on the gas-phase ion sampling arrangements used.^{16,19} Corresponding equations for I_B and I_E , analogous to those for I_A , have also been established. Moreover, the total electrospray current I is only dependent on the total conductivity of the entire solution, and only very weakly dependent on specific properties of the constituent electrolytes.^{16,19} According to literature, I changes very little as total electrolyte concentration is increased from 10^{-5} to 10^{-2} M.^{16,19} In addition, when analyte concentration in solution are increased, I and total ionic abundances I_{total} vary similarly, under ESI-MS conditions.^{17,19} Fairly good fits of experimentally (ESI-MS) ion signal abundances I_A , I_B and I_E have been obtained, when using equation (1).^{16,19} Furthermore, equations (1a) and (1b) express the competition among bulk ions to enter the gas phase. The abundance I_A , depends only on the ratio k_A/k_B and not on the individual values k_A and k_B .^{16,17,19} The ratio k_A/k_B expresses, thus, the yield ratio of gas phase ions A^+ and B^+ relative to bulk solution concentrations. Tang and Kebarle^{16,19} have developed an alternative method for evaluating the k_A/k_B ratio. In this alternative method, they use the ratio of the relative

sensitivities of two different analytes A and B, i.e. ratio I_A/I_B . The concentration dependence predicted by equation (1) is given by:

$$\frac{I_A}{I_B} = \frac{k_A[A]}{k_B[B]} \quad (1c)$$

The ratio k_A/k_B can be determined experimentally, most conveniently by using solutions where $[A] = [B]$.^{16,19} According to literature, and as previously referred, analytes A and B ion intensities dependence, on their corresponding concentrations in solution, is well reproduced by equation (1b). An exact fit with constant ratio k_A/k_B expected from equation (1c) is, however, only observed for $[A] = [B] > 10^{-5}$ M.^{16,19} For lower concentrations $[A] = [B]$, the ratio decreases to the limit $k_A/k_B = 1$.^{16,19}

In the present report we decided to use Tang and Kebarle methodology,^{16,19} in order to investigate the analyte and HEPES buffer species ion abundances dependence on the corresponding concentrations in solution, and also to disclose possible effects the electrolyte HEPES buffer displays on the ionization of analyte species, under ESI-MS conditions. Knowing that selected analyte species possess basic moieties that can be fully ionized in solution, or be ionized to some extent, even at solution physiological pH, together with the fact that HEPES buffer sodium salt displays electrolyte behaviour, equation (1a) could be fairly applied, in this study, to describe ESI mass spectra component ion abundances dependence on their corresponding concentrations in the electrosprayed solution. In the analyte solutions, we have considered that the HEPES buffer is the dominant electrolyte, as it can be seen from m/z 261 buffer ion abundances variation in Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**. In Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**, it can also be seen, as already mentioned, that two regions appear in the ESI mass spectra of the

analytes studied. These two regions encompass the lower-concentration range, from the lower limit of detection, up to an analyte concentration of *ca.* 10^{-5} M, and the high-concentration range, from an analyte concentration of *ca.* 10^{-5} M to the upper limit of detection, i.e. analyte concentrations of 10^{-3} / 10^{-2} M. Considering equation (1a), selected analyte and HEPES buffer species are designated by AX and EX, respectively. In the low-concentration range (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**), ESI mass spectra analyte ion abundances, although appearing, in the logarithmic plot, to increase when increasing the analyte concentration in solution, they depend on the concentration of the HEPES buffer when this concentration is constant and higher than the analyte concentrations in the electrosprayed solutions. Above an analyte concentration of *ca.* 10^{-5} M, i.e. high-concentration range of analytes, ESI mass spectra analyte ion abundances remain almost constant (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**). Thus, from equation (1a) (high-concentration range), it can be deduced that the HEPES buffer has a minor contribution to the analytes ion abundances variations observed. The sensitivity coefficient, k , of the HEPES buffer, seems to have a low value, which is consistent with the solvent electrolyte impurities sensitivity coefficients usually reported.^{16,17,19} Similar conclusions can be drawn with respect to HEPES buffer ion abundances (I_E) variations, on the basis of equation (1a). It is to bear that ESI mass spectra analytes ion abundances, for acetyl-lysine, histidine and 3-amino-1,2,4-triazine analytes, in particular, appear to saturate for higher analyte concentrations in solution (Fig. 2 – **A2**, **B2** and **C2**), in comparison to acetyl-arginine ion abundances (Fig. 2 – **D2**). On the basis of equation (1a), it can be deduced that acetyl-lysine, histidine and 3-amino-1,2,4-triazine analytes have similar sensitivity coefficients, k , values, although lower than the sensitivity coefficient of acetyl-arginine. This was to be expected, since acetyl-arginine is a more basic analyte, in comparison to the other selected analytes. Therefore, acetyl-arginine species “efficiency”, when they

migrate from the droplets bulk solution to the droplets charge surface, to acquire suitable charge in the gas phase, is high. In what sensitivity coefficients are concerned, the findings for acetyl-lysine, histidine and 3-amino-1,2,4-triazine analytes can also be applied to creatinine and tyrosine analytes. In the low-concentration analytes range, and for analyte solutions with a 10^{-5} M HEPES buffer concentration, the capillary current I is carried by the dominant electrolyte, i.e. HEPES buffer, which is at a constant concentration. Therefore, I is constant in this concentration range. In addition, we can assume that the sum of the mass-analysed total ion abundances, $I_{\text{total}} = I_{\text{A}} + I_{\text{E}}$, is also constant in the low-concentration range, because it is dominated by the electrolyte E (HEPES buffer). Accounting for the important contribution of HEPES buffer, in the observed ESI mass spectra analyte ion abundances variation, it is possible to deduce that competition exists between analyte and HEPES buffer species, from the droplets bulk solution to the droplets surface, in the conversion process to gas-phase ions. In the analytes high-concentration range, i.e. for analyte solutions with a 10^{-5} M HEPES buffer concentration, the electrospray current I slightly increases, together with the total ion abundances, since there is an enhanced amount of analyte species in the electrosprayed solution. This enhanced amount of ions does not lead to an increase of ESI mass spectra analyte ion abundances, because analytes species, which usually have higher sensitivity coefficients than the HEPES buffer one, rapidly saturate the droplets surface. This droplets surface saturation does not lead to an efficient ion species release and ion generation, in the gas phase. Furthermore, when analyte solutions, with a 10^{-3} M HEPES buffer concentration, are electrosprayed, the ESI mass spectra also reveal the presence of two regions, comparably to what happens when analyte solutions, with a HEPES buffer concentration 100-times smaller (i.e. 10^{-5} M), are electrosprayed (Fig. 2 – **A1**, **B1** and **C1**). As in the latter case, the low- and high-concentration ranges of

analytes, that define the two mentioned regions, are very similar to the ones determined for analyte solutions with a 10^{-5} M HEPES buffer concentration, under ESI-MS conditions. From Fig. 2 – **A1**, **B1**, **C1** and **D1**, it can be observed that ESI mass spectra m/z 261 buffer ion abundances did not vary significantly when increasing the analyte concentration in solution. From equation (1a), these constant m/z 261 ion abundances are most probably due to the fact that the HEPES buffer is at a concentration higher than the concentration of the analytes in the electrosprayed solutions. Interestingly, in Fig. 2 – **D1** and **D2**, ESI mass spectra analyte ion abundances appear to saturate, when analyte solutions with low and high HEPES buffer concentrations are electrosprayed. This applies only for the acetyl-arginine analyte ESI mass spectra. In Fig. 2 – **D1** and **D2** also, when analyte solutions with a 10^{-5} M HEPES buffer concentration are electrosprayed, ESI mass spectra analyte ion abundances saturate for analyte concentrations above *ca.* 10^{-5} M, whereas for analyte solutions with a 10^{-3} M HEPES buffer concentration, ESI mass spectra analyte ion abundances saturate for analyte concentrations above *ca.* 10^{-4} M, instead. In other words, when the concentration of the HEPES buffer is increased 100-times, from 10^{-5} to 10^{-3} M, in the analyte solutions to be electrosprayed, analyte ion signal abundances saturation does not occur (Fig. 2 – **D1**), for an analyte concentration in solution 100-times higher, in comparison to the analyte ion signal saturation at an analyte concentration of 10^{-5} M. From equation (1a), it can be deduced that acetyl-arginine ion signal abundances depend not only on the components concentration in the solution to be electrosprayed, but also on their sensitivity coefficients, k . In addition, sensitivity coefficients, in this particular analyte (acetyl-arginine) + HEPES buffer system, appear to vary when low and high HEPES buffer concentrations are used, in the electrosprayed solutions. Since ion abundance of a given analyte (I_A) depends only on the ratio k_A/k_B , and not on the individual values k_A

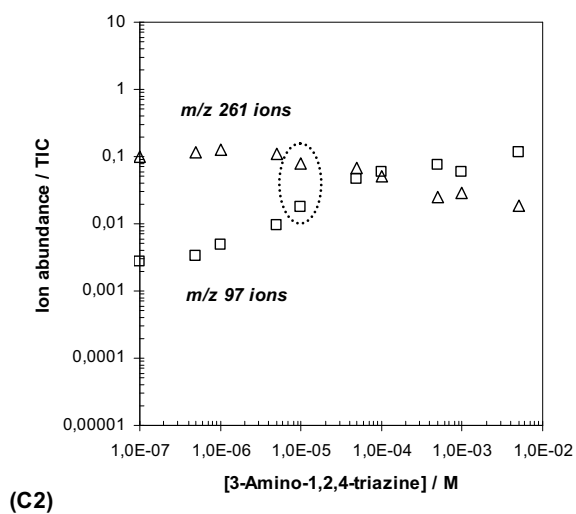
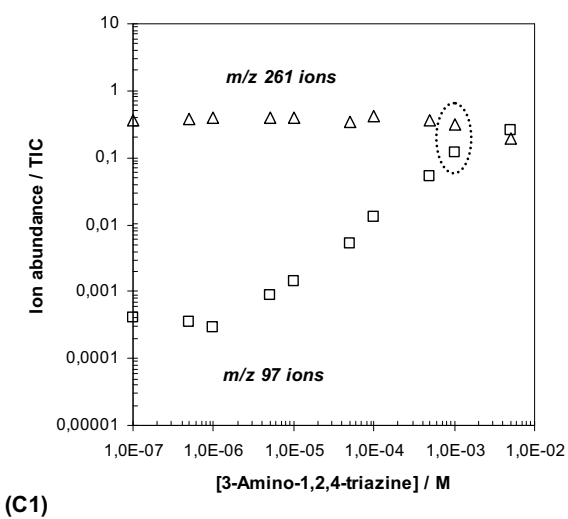
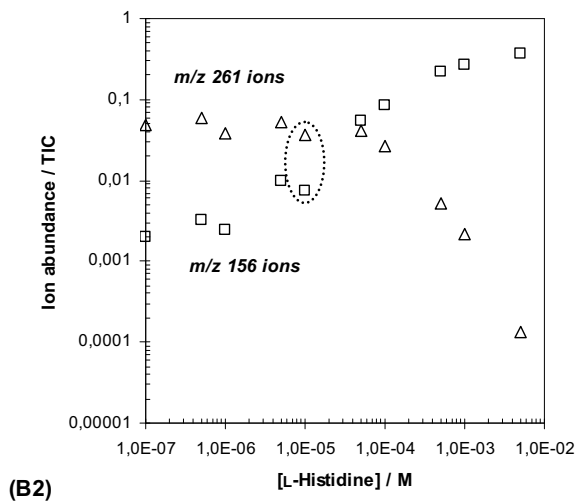
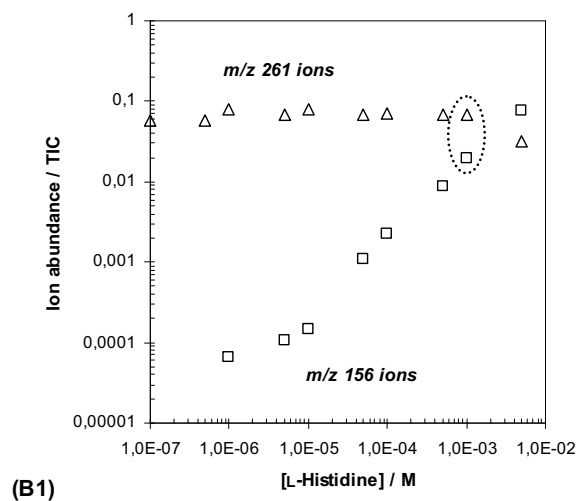
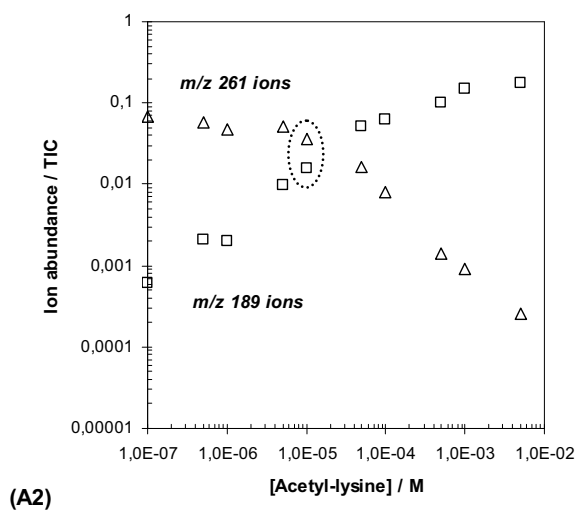
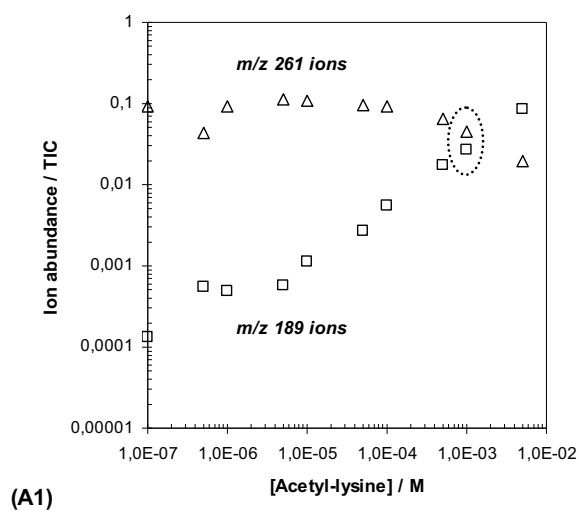
and k_B , we have explored the latter result by determining k_A/k_B variations, in terms of equation (1c). Considering an electrolyte E (concentration of *ca.* 10^{-5} M), such as the solvent electrolyte impurity, it has been reported in the literature that the k_A/k_B ratio approaches unity, at low [A] and [B] concentrations, as a consequence of depletion of ions A^+ and B^+ from the droplets.¹⁹ At $[A] = [B]$ far below 10^{-5} M, the electrospray current and the total charge of the droplets are maintained by the presence of the electrolyte E, the concentration of which is much higher than the analyte ones. Under these conditions, ionic species such as A^+ and B^+ , when present at very low concentrations, but having large coefficients k_A , k_B , are forced to the gas phase, which depletes their concentration in the droplets bulk.¹⁹ Therefore, analyte concentrations in the droplets bulk become very much smaller than the initial concentrations [A] and [B], leading to an apparent $k_A/k_B = 1$ value.¹⁹ Moreover, an exact fit with constant k_A/k_B ratio, expected on basis of equation (1c), is observed only for $[A] = [B] > 10^{-5}$ M.^{16,19} In the present study, however, one question arises, concerning the value of the k_A/k_E ratio, when the electrolyte E, i.e. HEPES buffer, is present in the analyte solution with a concentration higher than 10^{-5} M. The HEPES buffer possesses electrolyte nature, together with a behaviour observed to be similar to the one of the solvent electrolyte impurity, under ESI-MS conditions. It seemed therefore also interesting to observe if the electrolyte HEPES buffer, when present in the analyte solutions at concentrations above 10^{-5} M, could display any further effect, besides promoting analyte ion signal suppression. In Fig. 2 – **A**, **B**, **C** and **D**, when analytes and HEPES buffer have the same concentration in solution, i.e. 10^{-5} M (Fig. 2 – **A2**, **B2**, **C2** and **D2**) and 10^{-3} M (Fig. 2 – **A1**, **B1**, **C1** and **D1**), the ratio $I_A/I_E = k_A/k_E$, which corresponds to vertical distance between $\log I_A$ and $\log I_E$,^{16,19} increases when $[A] = [E]$ changes from 10^{-5} M to 10^{-3} M, in all systems studied. In fact, it can be seen that k_E/k_A ratios for acetyl-lysine,

histidine and 3-amino-1,2,4-triazine analytes, in particular, decrease when, $[A] = [E]$, changes from 10^{-5} to 10^{-3} M (Fig. 2 – **A**, **B** and **C**), meaning that k_A/k_E increases, in that concentration order. Although analyte ion abundances were used without correction, concerning mass to charge (m/z)-dependent transmission in the mass spectrometer, they may be used for k_A/k_E ratios determination, since we are comparing ion abundances logarithmic differences within the same groups of ions. The above results differ from the expected constant k_A/k_B ratio on basis of equation (1c), when $[A] = [B] > 10^{-5}$ M, which has been observed experimentally for solutions of two analytes in a solvent (three components solutions), under ESI-MS conditions.^{16,19} An explanation for these different results can rely on the nature of the HEPES buffer species, when compared to the analytes nature. The result we obtained seems interesting, since it suggests that the “efficiency” of analyte bulk solution species, to yield ions in the gas phase, increases, when analyte solutions possess a high HEPES buffer concentration, in comparison to corresponding solutions with low HEPES buffer concentration. We expected that increasing the concentration of HEPES buffer, in the analyte solutions, would lead to an increase of analyte ion signal suppression under ESI-MS conditions. Indeed, despite the HEPES buffer species in the analyte solutions to be electrosprayed, promote competition for analyte species, from the droplets bulk solution, to the droplets surface, an increase of analyte species as well as of buffer species in the droplets surface, should certainly lead to analyte ion signal suppression, and not to analyte ion signal enhancement. In addition, despite I changes with electrolyte concentration, in the analyte solution, these changes are relatively small, even if the electrolyte concentration increases significantly. Thus, electrolytes with high concentrations, in the analyte solution, cannot provide a reasonable ion current, that could reflect the enhanced amount of ion species in the droplets bulk solution, and consequently the corresponding

ion generation, under ESI-MS conditions. Other phenomena should also be considered in order to support the more efficient ionization of analyte species, when the electrolyte HEPES buffer concentration is significantly increased (i.e. from 10^{-5} to 10^{-3} M). The HEPES buffer compound is reported to display surface activity.^{5,6} It is also known that zwitterionic buffers, such as the HEPES buffer, often possess surface activity in solution, and that this surface activity is important for high buffer concentrations in solution. The effect that the HEPES buffer displays surface activity on analyte solutions, can reasonably explain the ionization of analyte species, in analyte solutions with a higher HEPES buffer concentration. Despite basic analyte species appeared to have sensitivity coefficients, k , higher than the one of the HEPES buffer, the HEPES buffer species can rapidly merge to the droplets charge surface as a result of its surface activity. Since surface-active species control the distribution and concentration of ions in the droplets surface,^{11,12} one might deduce that more efficient charging of gas-phase analyte species occurs, which might be related to a more efficient evaporation of the ESI droplets.²⁰ In fact, this process is favoured, most probably due to the analytes higher sensitivity coefficients with respect to the HEPES buffer, reflecting a further stimulation of analyte species migration, from the droplets bulk solution to the droplets charge surface. Nevertheless, it does not seem possible to know for sure, whether, or not, the HEPES buffer species influences the charge density of the droplets, under ESI-MS conditions. In other words, attending to the particular effects of the HEPES buffer species on the process of droplets evaporation/ionization, we may hypothesise that analyte species, with charge, are continuously released, mostly as discrete ions, from the droplets charge surface, as soon as ions concentration in the droplets reaches a critical value. These “host” droplets could exist, as long as analyte species are available in the droplets surface, and in the droplets bulk solution. This hypothesis, concerning

ionization of analyte solutions with high HEPES buffer concentration, agrees fairly well with the ionic evaporation model (IEM), proposed by Thomson and Iribarne,^{21,22} extended to include the effect of surface activity.^{16,19} Based on the IEM model, it has been assumed, in the literature, that the k_A/k_B ratios, observed in the high concentration range of analytes ($10^{-5} - 10^{-3}$ M), reflect ion evaporation constants k_{IA}/k_{IB} as well as enrichments due to surface activity, i.e. K_{SA}/K_{SB} .^{16,19} Enrichment of the droplet surface, on the more surface-active component, probably occurs in the evaporation stages of the parent droplets, among Rayleigh instability explosions.^{16,19} These evaporation stages are relatively long, which should allow enrichment of the surface with surface-active ions.^{16,19} Furthermore, the particular effect observed when high HEPES buffer concentrations are used, in the analyte solutions, suggests a correlation between gas phase and solution behaviours for the analytes studied. To reinforce this assumption, the same upper limit for analyte ion signal detection is observed when analyte solutions with low and high HEPES buffer concentrations are electrosprayed (Fig. 2 – **A**, **B**, **C** and **D**). The linear relationships observed for ESI mass spectra analyte ion abundances with analyte concentrations in solution, above 10^{-5} M, can reasonable be explained by these phenomena (Fig. 2 – **A1**, **B1**, **C1** and **D1**). In the latter figure, m/z 261 HEPES buffer ion abundances, in the ESI mass spectra, did not vary significantly, which is consistent with an accumulation of the HEPES buffer species in the droplets surface. The fact the accumulation of buffer ions in the droplets surface, when analyte solutions with a 10^{-3} M HEPES concentration are electrosprayed, seems to be consistent with the assumption that high HEPES buffer concentrations have low importance, in competition processes, between pre-ionized analyte and buffer species, from the droplets bulk solution to the droplets surface. It is to bear that m/z 261 HEPES buffer ion abundances variations appear to be minimized, *ca.* 10-times, when in the analyte solutions, a high

HEPES buffer concentration (10^{-3} M) is used, in comparison to analyte solutions where a lower HEPES buffer concentration (10^{-5} M), is used (Fig. 2 – **A**, **B**, **C** and **D**). In addition, it has been reported that low amounts of non-volatile buffers in the analyte solutions improve ESI mass spectra analyte ion signal response, for buffer concentrations below cmc, in particular.⁸ Furthermore, analyte ion signal suppression could occur, when analyte solutions with higher HEPES buffer concentration, are electrosprayed. Analyte ion signal suppression cannot, however, be extended to the whole analyte concentration range studied, particularly for high analyte concentrations in solution. Once again, to reinforce this assumption, the same analyte ion signal detection upper limit was observed, when electrospraying analyte solutions with high and low HEPES buffer concentrations.



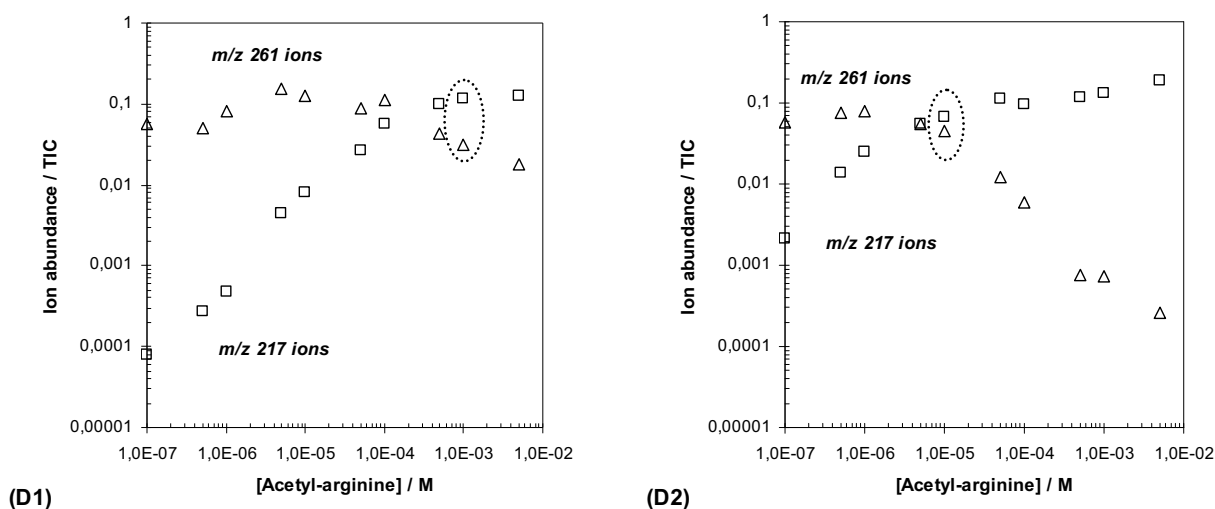


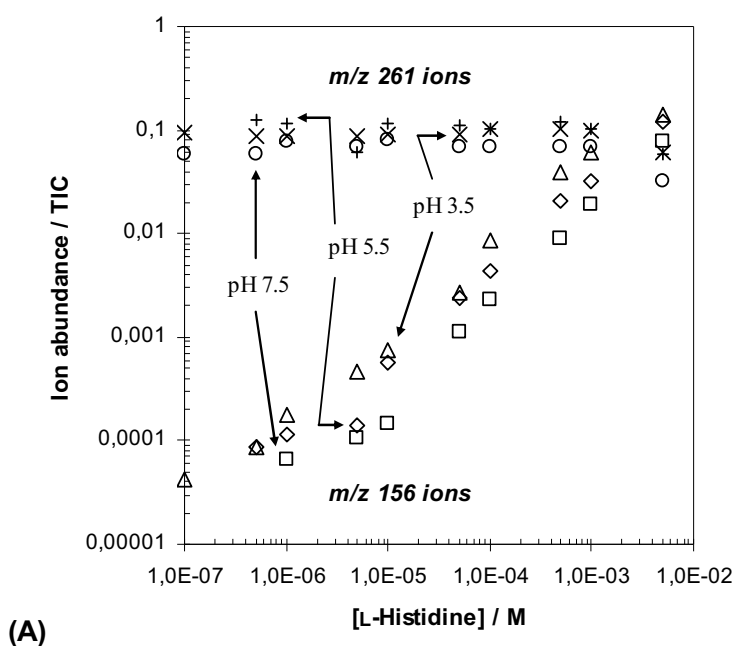
Figure 2. ESI mass spectra ion abundances of protonated analytes and HEPES buffer molecules as a function of analyte concentrations in solution. **A**, **B**, **C** and **D** refer to the analytes, acetyl-lysine, L-histidine, 3-amino-1,2,4-triazine and acetyl-arginine, respectively. **1** and **2** (e.g. in **A1** and **A2**) refer to analyte solutions (pH 7.5) having the HEPES buffer with two different concentrations 10^{-3} and 10^{-5} M, respectively. In the figure, \square and Δ correspond to protonated analytes (m/z 189 ions for acetyl-lysine; m/z 156 ions for histidine; m/z 97 ion for 3-amino-1,2,4-triazine; m/z 217 ions for acetyl-arginine) and protonated HEPES buffer molecules (m/z 261 ions), respectively. The dots, in the ellipses, refer to analytes and HEPES buffer having the same concentrations in solution, i.e. 10^{-5} and 10^{-3} M. Ion abundances ratio account for ion abundances, normalized to ESI mass spectra total ion current (TIC).

Effect of solution pH on analyte ion signal response.

Solution pH variation can significantly influence analytes species acid/base equilibrium, thus altering their degree of positive or negative charging via protonation/deprotonation.²³ Therefore, understanding how pH variation of an analyte solution can influence the appearance of the ESI mass spectra recorded for an analyte species, can lead to disclosure of a potential relation between analytes concentration in solution and their ion abundances in the gas phase. Furthermore, for the six compounds studied, solution pH was varied, and analyte ion signals have been related to their corresponding concentrations in solution. It was observed, for example, that for histidine with a HEPES buffer concentration of 10^{-3} M, the m/z 261 buffer ion

abundances, in the ESI mass spectra, did not vary significantly, as solution pH was lowered from 7.5 to 5.5, or even to 3.5 (Fig. 3 – **A**). In the ESI mass spectra, although the m/z 261 buffer ions abundance did not vary significantly with solution pH, protonated histidine molecule (m/z 156 ions) abundances were found to vary (Fig. 3 – **A**). This variation was found to be enhanced when more acidic histidine solutions are electrosprayed, such as the ones at solution pH 3.5. At such a pH, more ionized histidine species can be generated, in comparison to the ones formed in solutions at physiological pH. This observation is consistent with the fact that histidine is an amino acid having a weakly basic side chain group (imidazole: $pK_a = 6.1$, in water). In what m/z 261 ion abundances variation is concerned, the same behaviour was found for the other compounds studied (not shown), with the exception of 3-amino-1,2,4-triazine. Fig. 3 – **B** shows that ESI mass spectra analyte ion abundances do not vary when solution pH is varied from 7.5 to 5.5. The same was observed for m/z 261 ion abundances (Fig. 3 – **B**). For analyte solutions at pH 3.5, it was observed that, for both analyte and HEPES buffer species, the ESI mass spectra ion abundances were minimized, in comparison to the ones observed for pH 7.5 and 5.5 solutions (Fig. 3 – **B**). At the lower solution pH studied (3.5), it appears that buffer species may neutralize analyte species (counter ion effect). This could account for the observed ESI mass spectra ion abundances minimization for both analyte and HEPES buffer (Fig. 3 – **B**). For high acidic analyte solutions, it could happen that analyte species, when merging to the droplets surface, increased the droplets charge density, to a point where some neutralization of the charged species could occur. In addition, neutralization of 3-amino-1,2,4-triazine species can favourably occur, since they have resonant structures. Thus, 3-amino-1,2,4-triazine species, while they accommodate charge in different locations of their molecules, could easily allow coordination/complexation with other polar species. As

already mentioned, 3-amino-1,2,4-triazine sensitivity coefficient, k , under ESI-MS conditions, appears to be closer to the HEPES buffer one, and thus it is lower than the other analytes sensitivity coefficients. This assumption argues for an increased competition between 3-amino-1,2,4-triazine and HEPES buffer species, in the conversion process to gas-phase ions, when compared to the remaining analyte systems studied. Therefore, the increased number of species encountered, together with the fact that 3-amino-1,2,4-triazine are resonant structures, can also support minimization of both analyte and HEPES buffer species detection, under ESI-MS conditions. Furthermore, for progressively lower histidine solution pH, ion signal responses appear to increase (Fig. 3 – A), and 3-amino-1,2,4-triazine solutions at pH 7.5 and 5.5 produce similar analyte species ion signal responses, under ESI-MS conditions. In this case, it may therefore be recognized that the solution pH effect, on the ESI-MS response, is minimized, and that effect usually does not reflect solution behaviour.²³



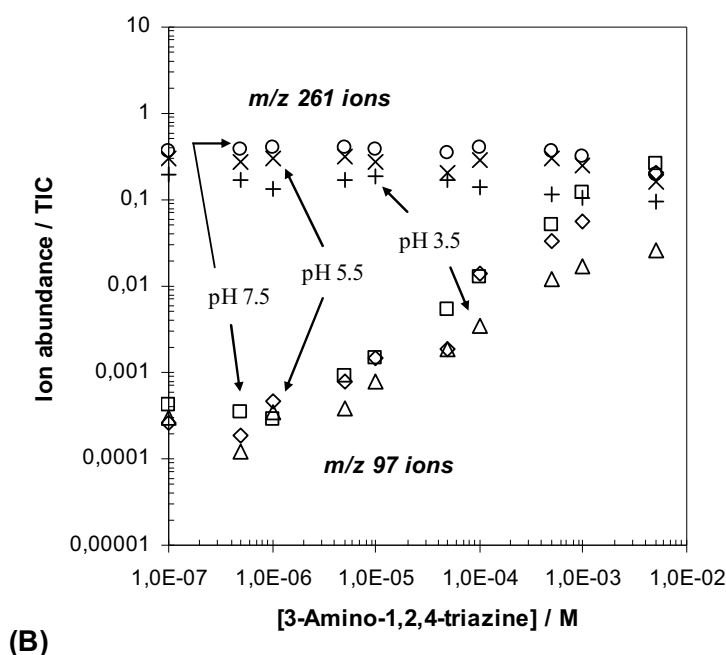


Figure 3. ESI mass spectra ion abundances of protonated histidine (m/z 156 ions), 3-amino-1,2,4-triazine (m/z 97 ions) and HEPES buffer (m/z 261 ions) molecules, respectively, at different histidine and 3-amino-1,2,4-triazine concentrations in solution. The HEPES buffer compound present in the analyte solutions has a concentration of 10^{-3} M, and solution pH was made to vary (pH 7.5, 5.5 and 3.5). Ion abundances ratio account for ion abundances normalized to ESI mass spectra total ion current (TIC).

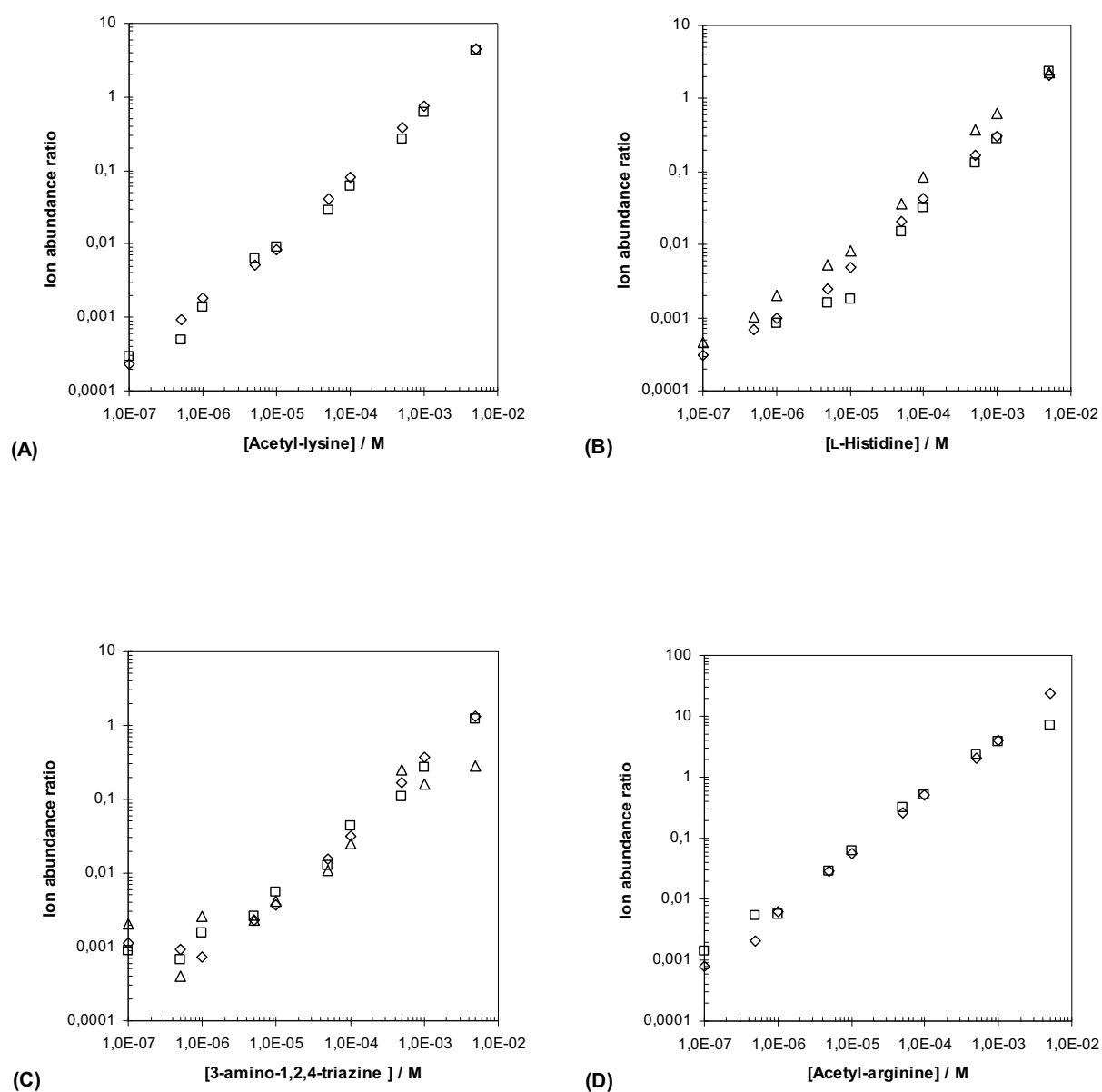
HEPES buffer as internal standard for analytes under ESI-MS conditions.

Even when analytes solution pH was varied, with the exception of highly acidic 3-amino-1,2,4-triazine solutions, it did not produce significant HEPES buffer ESI mass spectra ion signal variations, for a reasonable buffer concentration (10^{-3} M) at least. All these observations led us to use the HEPES buffer compound, as an internal standard, for the ESI mass spectrometric analysis performed.

For the amino acids aminotriazine and the imidazolone studied, in a 10^{-3} M HEPES buffer solution, at pH 7.5, a linear relationship between the normalized protonated amino acids, aminotriazine and imidazolone molecules abundances (normalized to m/z 261 buffer ions abundances) and the amino acid, aminotriazine and

imidazole concentrations in solution, in concentration ranges as follows: $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$ M (acetyl-lysine); $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$ M (L-histidine); $5 \times 10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$ M (3-amino-1,2,4-triazine); $10^{-7} - 5 \times 10^{-4}$ M (acetyl-arginine); $10^{-6} - 5 \times 10^{-3}$ M (creatinine); $5 \times 10^{-5} - 5 \times 10^{-3}$ M (L-tyrosine), was observed (Fig. 4). Acetyl-lysine, 3-amino-1,2,4-triazine and acetyl-arginine solutions, at pH 5.5, revealed a behaviour similar to the one at pH 7.5, with respect to the protonated amino acids and aminotriazine molecules ESI mass spectra ion signal and to the amino acids and aminotriazine concentration in solution (Fig. 4 – A, C and D). This similarity argues for acetyl-lysine, 3-amino-1,2,4-triazine and acetyl-arginine molecules being fully protonated in pH 7.5 solutions. pH Solutions at 3.5 were not studied, since amino acids acetyl-lysine and acetyl-arginine, in particular, should presumably be fully protonated in pH 7.5 and 5.5 solutions. Furthermore, histidine and creatinine are less basic than acetyl-lysine, 3-amino-1,2,4-triazine and acetyl-arginine, and tyrosine is a neutral species. For the compounds histidine, creatinine and tyrosine, the latter, in particular, analyte ion signals are enhanced in more acidic solutions, i.e. in pH 5.5 and 3.5 solutions, when the HEPES buffer concentration is 10^{-3} M (Fig. 4 – D, E and F). Initial solution pH is known to influence solution-phase equilibria of analyte molecules charge attachment, although such an influence appears to be minimized in the ESI mass spectra of a charged analyte species.²¹ The relationship between the initial solution pH and the analytes ESI mass spectra ion signal was investigated, although the basicity of the analytes can also be used to probe the relation between solution and gas-phase behaviours. A good correlation of charge states observed in ESI-MS and nucleoside bases basicity (pKa) has been reported in the literature.²⁴ For the more basic and neutral compounds we studied, acetyl-arginine and tyrosine have been observed to behave differently, under ESI-MS conditions. For higher and lower analyte concentrations in

solution, respectively, acetyl-arginine and tyrosine, in the presence of a 10^{-3} M HEPES buffer, revealed either a slight decrease or a slight enhancement of ion signals (Fig. 4 – **A** and **D**; pH 7.5). The ability of analyte molecules to protonate/deprotonate in solution, can be somehow related to their sensitivity coefficients, k , which expresses the efficiency that solution-phase analyte species have, to migrate from the bulk solution, to the droplets charge surface, and acquire charge, during the process of electrospray ionization. Therefore, it is expected that some saturation of solution-phase acetyl-arginine species occurs in the droplet charge surface, for higher acetyl-arginine concentrations in solution, in particular. For tyrosine, it might happen that the less charged solution-phase species and a minor species migration, although forced to the droplet surface, could not reflect the dynamics of the charge droplets evaporation. On the contrary, competition between the HEPES buffer and tyrosine species, for the droplets charge surface, occurs for low HEPES buffer concentrations in solution, as well as for high HEPES buffer concentrations. Tyrosine and HEPES buffer species are structurally related. This could explain the enhancement of tyrosine ESI mass spectra ion signals, for tyrosine concentrations in solution up to 5×10^{-5} M (10^{-3} M HEPES buffer) (Fig. 4 – **F**). Moreover, the minor discrepancies observed in the magnitude order of the normalized analyte ESI mass spectra ion abundances (Fig. 4), might account for the ion abundances used, uncorrected with respect to mass to charge (m/z)-dependent transmission in the mass spectrometer.¹³



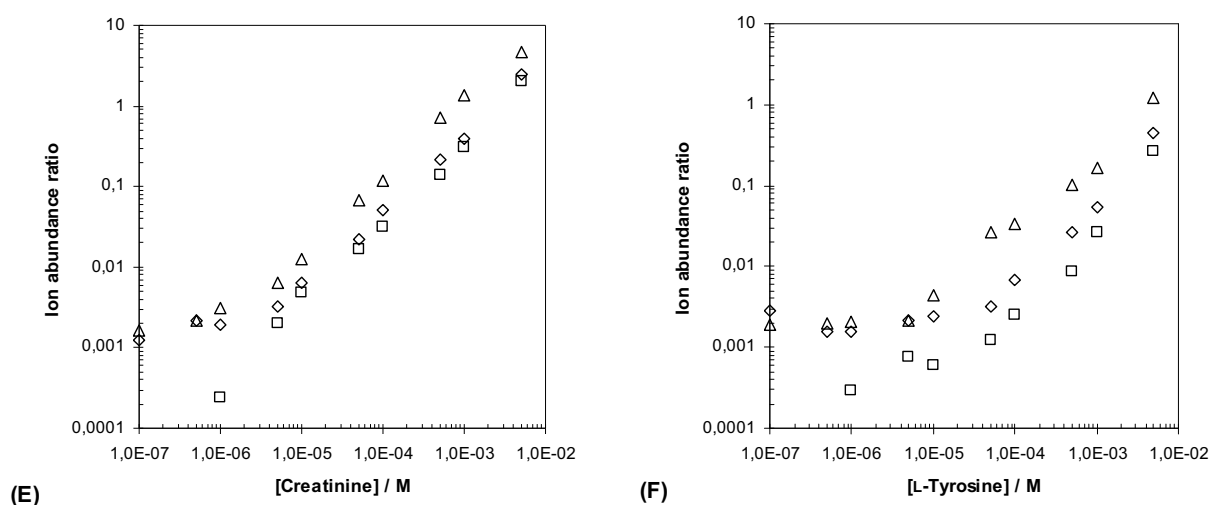


Figure 4. ESI mass spectra protonated analyte molecules ion abundances for acetyl-lysine (A), L-histidine (B), 3-amino-1,2,4-triazine (C), acetyl-arginine (D), creatinine (E) and L-tyrosine (F) normalized to m/z 261 buffer ions (most prominent buffer ions in the ESI mass spectra), as a function of analyte concentrations in solution. For example, in (B): □ m/z 156 ions (protonated histidine molecules) (10^{-3} M HEPES buffer solution, at pH 7.5); ◇ m/z 156 ions (10^{-3} M HEPES buffer solution, at pH 5.5); Δ m/z 156 ions (10^{-3} M HEPES buffer solution, at pH 3.5). □, ◇ and Δ in (A), (B), (D) and (E) have the same meaning as in (C) (where adequate), although for different m/z values, i.e. m/z 189 (A); m/z 97 (C); m/z 217 (D); m/z 114 (E); m/z 182 (F). The latter ions correspond to protonated molecules of acetyl-lysine, 3-amino-1,2,4-triazine, acetyl-arginine, creatinine and L-tyrosine, respectively.

The ESI mass spectra ion signal observed, corresponding to 5×10^{-7} and 10^{-7} M compound concentrations in solution, for L-histidine (B), creatinine (E) and L-tyrosine (F) compounds, was not taken into account, since the ESI mass spectra recorded were found to possess very low total ionic currents, in comparison to mass spectra obtained for higher analyte concentrations in solution.

CONCLUSIONS

Solutions of six physiologically relevant compounds in the presence of the biological HEPES buffer compound (electrolyte) were studied, under ESI mass spectrometric conditions. The effects of analyte and coanalyte/electrolyte concentrations and solution pH on ESI ion signal response have been investigated. According to literature, the addition of high amounts of non-volatile buffers, including some zwitterionic buffers developed by Good et al. (e.g. CHAPS), were found to strongly interfere with ion generation, leading therefore to analyte ESI mass spectra ion signal suppression.^{8,9} When analyte solutions with a 10^{-5} M HEPES buffer concentration are electrosprayed, the analyte ESI mass spectra ion signals revealed the presence of two regions in the mass spectra.^{16,17,19} The 10^{-5} M HEPES buffer concentration used, is similar to the one of electrolyte impurities present in solvents such as water and methanol, commonly used in ESI-MS. In addition, the dependence of analyte and HEPES buffer ESI mass spectra ion abundances on the analyte concentration in solution, are consistent with literature results,^{16,17,19} when analyte solutions solely in the presence of solvent are electrosprayed. When analyte solutions with a much higher HEPES buffer concentration, *ca.* 10^{-3} M, are electrosprayed, ESI mass spectra revealed that analyte ion abundances vary linearly when the analyte concentration in solution is increased, particularly for analyte concentrations above 10^{-5} M. ESI mass spectra m/z 261 buffer ion abundances remained almost constant, in the analyte concentration range studied. The fact that the same upper limit, for analyte ion detection, was observed, when analyte solutions with either low or high HEPES buffer concentrations are electrosprayed, led us to suggest the occurrence of different phenomena contributing to the ionization of analyte species in the different HEPES buffer concentrations used, and especially for high HEPES buffer concentrations, where analyte ion signal suppression

is mostly predicted to occur. Results obtained from model equations,^{16,19} used to fit components (analyte + electrolyte) ion abundances with components concentration in solution, suggested that sensitivity coefficients of analytes appear to change when the HEPES buffer concentration increases from 10^{-5} to 10^{-3} M, in the analyte solutions to be electrosprayed. In fact, further results showed that the k_A/k_E ratio increases for analyte solutions with higher HEPES buffer concentration. This result is interesting and, together with all other findings, appears to support the assumption that, when analyte solutions, with a high HEPES buffer concentration are electrosprayed, the ionization of analyte species is improved, being most relevant for high analyte concentrations in solution. This phenomenon, dealing with the effect of high electrolyte concentrations in the analyte solutions, seems interesting. Mechanistically, we concluded that the HEPES buffer compound, with a reasonable concentration in the analyte solution, can more rapidly merge to the droplets charge surface than the analyte species. This can be explained by its zwitterionic nature and its recognized surface activity.^{5,6} It cannot, however, be postulated, whether or not the HEPES buffer species have some influence on the droplets charge density. Nevertheless, in view of the solution characteristics of the several analytes studied, it appears that the analytes sensitivity coefficients, k , are higher than the HEPES buffer one. Moreover, when the buffer species concentrate in the droplets surface, the distribution and concentration of ions in the droplets charge surface is improved,^{11,12} leading therefore to a more efficient charging of gas-phase analyte species. This can also be due to a more efficient evaporation of ESI droplets,²⁰ and accounts for the linear relationship observed between analyte species solution and gas phase behaviours. This phenomenon, which appears to reflect efficient analyte species ionization, under ESI-MS conditions, can be used to develop suitable strategies for improving the extension of analytes linear dynamic range to higher analyte

concentrations in solution, i.e. 10^{-5} M. Furthermore, the effect of solution pH on the analyte ion signal responses was observed to be minimized, with respect to solution behaviour. The analytes acid/base chemistry appears to have a relevant effect on analytes ion signals, with respect to solution behaviour. Moreover, knowing that the m/z 261 buffer ion signal responses did not vary significantly with the analyte concentration in solution (i.e. for analyte solutions with a 10^{-3} M buffer concentration), m/z 261 buffer ions was used as an internal standard for mass spectrometric analysis.

Our results suggest that, by controlling the droplets superficial effects, analyte species ionization can vary significantly. In addition, the phenomena occurring in the droplets charge surface appear to have a major role in the production of ions in the gas phase. We believe our study may also contribute to further sustain the importance of electrolytes and surface-active compounds in mass spectrometry, and, possibly, to better understand processes involved in the ESI mechanism.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Doctor Carlos Cordeiro and Professor Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their inestimable contribution to this work. Discussions with Professor Susana Santos (CQB-FCUL, Portugal) are also acknowledged. One of the authors, M. A. Saraiva, thanks FCT (Portugal) for financial support (SFRH/BD/3162/2000).

REFERENCES

1. Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **246**: 84 (and references therein).
2. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 216.
3. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 755.
4. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 1346.
5. Vasconcelos MT, Azenha MA, Lage OL. *Anal. Biochem.* 1996; **241**: 248.
6. Vasconcelos MT, Azenha MA, Almeida CM. *Anal. Biochem.* 1998; **265**: 193.
7. Good NE, Winget GD, Winter W, Connolly TN, Izawa S, Singh RMM. *Biochemistry.* 1966; **5**: 467.
8. Ogorzalek Loo RR, Dales N, Andrews PC. *Protein Sci.* 1994; **3**: 1975.
9. Rundlett KL, Armstrong DW. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 3493.
10. Borowiec JA, Boorn AW, Dillard JH, Cresser MS, Browner RF, Matteson MJ. *Anal. Chem.* 1980; **52**: 1054.
11. Kornahrens H, Cook KD, Armstrong DW. *Anal. Chem.* 1982; **54**: 1325.
12. Ward TJ, Armstrong DW, Czech BP, Koszuk JF, Bartsch RA. *Anal. Chim. Acta.* 1986; **188**: 301.
13. Sunner J, Nicol G, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1300.
14. Lo TW, Selwood T, Thornalley PJ. *Biochem. Pharmacol.* 1994; **48**: 1865.
15. Bharatam PV, Iqbal P, MaldeA, Tiwari R. *J. Phys. Chem. A.* 2004; **108**: 10509.
16. Kebarle P, Tang L. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 972A.
17. Kebarle P, Ho Y., In *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Cole RB (ed.). John Wiley & Sons, New York, 1997 (chap. 1).
18. Bruins AP., in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Cole RB (ed.). John Wiley & Sons, New York, 1997 (chap. 3).

19. Kebarle P. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 804.
20. Cech NB, Enke CG. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; **20**: 362.
21. Iribarne JV, Thomson BA. *J. Chem. Phys.* 1976; **64**: 2287.
22. Thomson BA, Iribarne JV. *J. Chem. Phys.* 1979; **71**: 4451.
23. Wang G, Cole R., in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*, Cole RB (ed.).
John Wiley & Sons, New York, 1997 (chap 4).
24. Tong X, Henion J, Ganem B. *J. Mass Spectrom.* 1995; **30**: 867.

5.2. Conclusões.

Foram estudadas soluções de 6 analitos, com interesse biológico, na presença do tampão não volátil HEPES por recurso a ESI-MS. Na análise ESI-MS, de soluções de analito, contendo 10^{-5} M de tampão HEPES, a variação das abundâncias iónicas dos iões analito e dos iões electrólito (HEPES), observadas nos espectros de massa ESI, em função da concentração do analito em solução, mostrou-se consonante com a variação proposta na literatura, para as abundâncias iónicas de espécies analito (e do electrólito impureza), em soluções de analito exclusivamente na presença de solvente, contemplando, no entanto, este último, a presença de um electrólito impureza, usualmente com uma concentração de $\sim 10^{-5}$ M, como é comum em solventes como a água e o metanol [4–6]. Estes resultados acima referidos não são de estranhar, uma vez que o tampão HEPES, presente nas soluções dos analitos seleccionados, possui uma concentração semelhante à descrita para a concentração do electrólito impureza, determinada para solventes como a água e metanol [4–6]. Uma situação distinta foi, no entanto, observada para as soluções de analito com 10^{-3} M de tampão HEPES, quando da análise ESI-MS. Neste caso particular, com um aumento de 100 vezes a concentração do electrólito HEPES (i.e. de 10^{-5} para 10^{-3} M) nas soluções dos analitos seleccionados, verificou-se que as abundâncias iónicas dos iões analito, observadas no espectro de massa ESI, variavam linearmente com a concentração do analito em solução, sobretudo para concentrações de analito superiores a 10^{-5} M, o que numa primeira análise poderia sugerir um deslocamento da gama linear dinâmica em ESI-MS para concentrações de analito elevadas. Na verdade, poderá existir supressão do sinal dos iões analito em ESI-MS, quando se aumenta a concentração do tampão HEPES de 10^{-5} M para 10^{-3} M nas soluções dos analitos. Todavia, a magnitude da supressão do sinal dos iões analito em ESI-MS, para um aumento da concentração do electrólito HEPES em solução de 10^{-5} M para 10^{-3} M, não reflecte a variação da concentração do tampão HEPES em solução, embora esta magnitude da supressão do sinal dos iões analito, i.e. num factor de 10, para o referido aumento da concentração do tampão HEPES, seja aproximadamente equivalente nas várias séries de analitos estudadas por ESI-MS. Interessa referir que poderá ocorrer supressão dos iões analito em ESI-MS, em soluções de analito com concentrações de tampão HEPES razoavelmente elevadas. No entanto, existe alguma controvérsia relativamente a este assunto.

Em primeiro lugar, existe evidência na literatura de que a adição de surfactantes, com concentrações inferiores à correspondente cmc, nas soluções de analitos, promove

um aumento do sinal dos iões analito, ao nível do espectro de massa ESI [9,10]. Sabendo que o tampão HEPES tem características de surfactante, é provável que para baixas concentrações deste tampão haja também um aumento do sinal dos iões analito em ESI-MS, o que pode explicar o aumento do sinal dos iões analito no espectro de massa ESI, quando soluções de analito com 10^{-5} M de tampão HEPES são analisadas (ESI-MS), em comparação com as correspondentes soluções de analito 100 vezes mais concentradas em tampão HEPES (i.e. 10^{-3} M). Tendo em consideração que os incrementos no sinal dos iões analito em ESI-MS são ligeiros (i.e. aumentos de 10–60 %) [9], quando do uso de concentrações baixas de surfactantes nas soluções de analitos, parece mais adequado recorrer ao conceito de actividade superficial de espécies existentes em solução, para interpretação da relação da variação do sinal dos iões analito em ESI-MS com a concentração do tampão HEPES nas soluções de analito.

Em segundo lugar, de acordo com o modelo de partição de equilíbrio, proposto por Enke [8] (ver secção 3.2.1.2.5), verificou-se, na base de resultados teóricos, que as variações da concentração superficial do ião analito à superfície do líquido são ligeiras, quando a concentração do electrólito na solução de analito aumenta de 10^{-5} M para 10^{-3} M. Porém, quando a concentração do electrólito na solução de analito aumenta para 10^{-2} M e 10^{-1} M verifica-se, ao invés, uma diminuição acentuada da concentração do ião analito na superfície do líquido [8]. Com base nos resultados obtidos por Enke, constata-se que variando a concentração do electrólito na solução de analito, de 10^{-5} M para 10^{-3} M, não deverá, em princípio, existir uma acentuada supressão do sinal dos iões analito no espectro de massa ESI, atendendo a que as concentrações superficiais do ião analito podem ser assumidas como proporcionais às abundâncias iónicas obtidas em ESI-MS [8]. Uma outra informação que pode ser retirada do modelo de Enke, é a de que a variação linear da concentração superficial do ião analito com a sua concentração analítica, para soluções de analito com elevadas concentrações de electrólito (i.e. 10^{-2} M e 10^{-1} M, sobretudo para 10^{-1} M), não atinge a concentração máxima do ião analito que se poderia observar, como se constata para soluções analito estudadas contendo concentrações de electrólito inferiores a 10^{-1} M [8]. No estudo apresentado neste capítulo, verificou-se que a variação linear das abundâncias iónicas dos iões analito, no espectro de massa ESI, com a concentração dos analitos em solução, para soluções de analito contendo 10^{-3} M de tampão HEPES, fora atingido o limite máximo de detecção, contrariamente ao previsto pelo modelo de Enke, para uma curva com o mesmo perfil, embora, no estudo de Enke, a curva fosse obtida para uma concentração de electrólito

de 10^{-1} M (i.e. 100 vezes superior que no presente estudo) [8]. Assim, com a informação disponível na literatura [8], não é possível assegurar, na base dos resultados obtidos no presente estudo, em particular os relativos à contribuição de elevadas concentrações de iões electrólito nas soluções de analito, e no que respeita à produção de iões na fase gasosa (ESI-MS), que exista supressão do sinal dos iões analito no espectro de massa ESI, nem que as curvas obtidas neste estudo sejam um reflexo das situações previstas pelos modelos existentes na literatura [8]. Todavia, esta última reflexão pode ter ainda um contorno diferente, uma vez que num estudo posterior, Constantopoulos et al. [11], verificaram que a concentração do excesso de carga na superfície do líquido aumenta, para soluções de analito contendo concentrações significativas de electrólito (i.e. 10^{-4} M e 10^{-3} M). Além disso, verificou-se, no mesmo estudo, que a resposta parcial dos iões analito aumenta com o aumento da concentração do electrólito nas soluções de analito [11]. Estes resultados foram obtidos na base de uma refinação do modelo de partição de equilíbrio proposto por Enke [8], embora haja de facto uma distinção significativa entre as variações da concentração dos iões analito e o factor de resposta para os mesmos iões, em função da concentração analítica das espécies em solução. Estes resultados sugerem que o aumento da concentração do electrólito nas soluções de analito pode conduzir ao aumento do sinal dos analitos em ESI-MS [11]. Com base nestas considerações pode ser possível, no presente estudo, interpretar o facto do limite máximo para a detecção dos iões analito ser equivalente para soluções de analito contendo baixa ou elevada concentrações de electrólito, analisadas por ESI-MS, contrariamente ao que se verifica por aplicação do modelo de Enke [8], em particular no que respeita à consideração exclusiva das variações da concentração superficial do ião analito à superfície do líquido. Deste modo, para soluções contendo elevadas concentrações de analito e de electrólito, verifica-se um aumento na eficiência de ionização dos iões analito nas condições empregues em ESI-MS. Os resultados obtidos por Constantopoulos et al., no que respeita ao aumento da resposta do analito com o aumento da concentração do electrólito em solução, foram interpretados na base do conceito de dupla camada eléctrica, em particular relativamente aos fenómenos ocorrentes na camada compacta [11]. Na camada compacta, espécies iónicas competem para o excesso limitado de espaço e/ou de carga, incluindo as espécies mais solvofílicas, que agora apresentam alguma perda da sua esfera de solvatação. É de notar que, em comparação com os resultados de Constantopoulos et al. [11], no presente estudo as espécies de electrólito possuem actividade superficial, ao invés das espécies de analito.

Na camada compacta referida, as espécies iónicas, dispendo de uma menor liberdade de movimento e alguma perda das suas esferas de solvatação, em especial as espécies iónicas mais solvofílicas, os efeitos da polaridade podem sobrepor-se aos efeitos da solvatação das espécies, podendo resultar no favorecimento da evaporação dos iões analito face aos iões electrólito, pois os primeiros são mais polares, não havendo assim tendência para a supressão dos iões analito em ESI-MS. Aliás, o aumento do sinal dos iões analito em ESI-MS pode ficar a dever-se à tendência que os estes iões têm para promover uma diminuição dos efeitos da actividade superficial dos iões do tampão HEPES no líquido [10]. Como os fenómenos que ocorrem na camada compacta não se encontram elucidados, embora este conceito se revele atractivo para a interpretação da influência de elevadas concentrações de sais nas soluções analisadas em ESI-MS, é possível tratar as observações do presente estudo considerando uma fase única, tal como na metodologia proposta por Tang e Kebarle [4–7], em que se contemplam fundamentalmente os fenómenos ocorridos no interior das gotas carregadas. Assim sendo, a metodologia desenvolvida por Tang e Kebarle [4–7] foi aplicada no presente estudo, para interpretação da dependência das abundâncias iónicas, obtidas em ESI-MS, das concentrações das espécies iónicas em solução. Através da determinação da razão de coeficientes k_A/k_E , que exprime a razão da produção de iões analito (A^+) e de electrólito (E^+), respectivamente, em relação às suas correspondentes concentrações em solução [7], constatou-se que para soluções de analito contendo 10^{-3} M de tampão HEPES, analisadas por ESI-MS, a razão dos coeficientes anteriores se revelou superior, em todos os casos estudados, em comparação com a razão dos coeficientes, determinada para a análise ESI-MS de soluções de analito contendo uma concentração de electrólito 100 vezes inferior (i.e. 10^{-5} M). Este resultado é, de certo modo, concordante com os obtidos por Constantopoulos et al. [11], relativamente ao aumento, segundo os autores, da resposta dos iões analito em função da concentração do analito em solução, para soluções analito contendo concentrações elevadas de electrólito. É de notar ainda, e de uma forma até intrigante, que apesar de poder existir um aumento da resposta dos iões analito com o aumento da concentração do electrólito em solução (aumento da força iónica), na região de saturação das curvas de calibração em ESI-MS, para elevadas concentrações de analito, o sinal de espécies mais superficialmente activas em ESI-MS aumenta sempre em relação ao sinal de espécies menos superficialmente activas, o que difere dos resultados obtidos no presente estudo, em que as espécies analito menos superficialmente activas, que as espécies do tampão HEPES, apresentam um aumento

do seu sinal em ESI-MS. Esta observação pode justificar os iões analito promoverem uma diminuição dos efeitos da actividade superficial dos iões do tampão HEPES na superfície do líquido, como se referira anteriormente. Consequentemente, e em termos dos efeitos que ocorrem na camada compacta, proposta no estudo de Constantopoulos et al. [11], pode significar mesmo que os efeitos da polaridade das espécies se possam sobrepor aos efeitos de solvatação, resultando, assim, num aumento da resposta das espécies analito, as espécies iónicas mais polares.

Nesta discussão, foi possível interpretar o comportamento das curvas de calibração obtidas no presente estudo, resultantes da relação das abundâncias iónicas das espécies detectadas no espectro de massa ESI com as concentrações correspondentes em solução, na base da informação disponível na literatura, para soluções de analitos contendo baixa e elevada concentrações de electrólito, analisadas por ESI-MS. O desafio residiu sobretudo na interpretação dos resultados obtidos na análise ESI-MS de soluções de analito contendo uma elevada concentração de electrólito, em que a variação linear das abundâncias iónicas das espécies de analito com a sua concentração em solução, e o facto do limite máximo para a detecção iónica ter sido atingido, associado aos resultados previstos na aplicação do modelo de partição de equilíbrio de Enke [8] e da metodologia de Tang e Kebarle [4–7], levaram a concluir que existe um aumento da eficiência de ionização das espécies analito em ESI-MS, para soluções de analito contendo uma significativa concentração de electrólito.

Os resultados obtidos neste estudo, para soluções de dois componentes, segundo as condições usadas em ESI-MS, podem ser proveitosos para a análise ESI-MS de misturas reaccionais. Em primeiro lugar, como as amostras das misturas reaccionais contêm uma concentração de tampão HEPES de 10^{-3} M, e concentrações de analito máximas de 10^{-3} M, deduz-se que estas soluções de analito tamponadas poderão, quando da análise ESI-MS, conduzir a um aumento da eficiência de ionização das espécies analito, uma vez que a concentração do excesso de carga na superfície do líquido pode aumentar significativamente, em função do aumento concentração de tampão HEPES existente na soluções analito analisadas, o que permite que mais espécies analito possam competir para o desenvolvimento do excesso de carga na superfície do líquido. Em segundo lugar, como poderá existir uma variação linear entre as abundâncias iónicas dos analitos em ESI-MS, com a correspondente concentração dos analitos em solução, e sobretudo para concentrações de analito superiores a 10^{-5} M,

pode ser possível monitorizar as reacções dos compostos amina livres com compostos de α -dicarbonilo. Todavia, esta monitorização deve ser restringida apenas a iões estruturalmente semelhantes, uma vez que iões estruturalmente diferentes podem ter diferentes eficiências de ionização face à presença de uma dada proporção de iões electrólito nas soluções analisadas por ESI-MS. Além disso, iões estruturalmente distintos, e com razões massa/carga distintas, experimentam também diferentes efeitos de discriminação da suas razões massa/carga, ao nível da operação do espectrometro de massa [12]. Mesmo que a referida variação linear das abundâncias iónicas dos analitos seja conseguida por perda de sensibilidade na análise, no caso de existir efectivamente supressão iónica dos iões analito em ESI-MS, a sua validade permanece. De facto, a amplitude da variação das abundâncias iónicas é ligeira, em comparação com a variação da concentração do electrólito nas soluções de analito analisadas por ESI-MS.

5.3. Bibliografia.

- [1] Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **246**: 84. (e referências incluídas)
- [2] Vasconcelos MT, Azenha MA, Lage OL. *Anal. Biochem.* 1996; **241**: 248.
- [3] Vasconcelos MT, Azenha MA, Almeida CM. *Anal. Biochem.* 1998; **265**: 193.
- [4] Kobarle P, Tang L. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 972A.
- [5] Tang L, Kobarle P. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 3654.
- [6] Kobarle P, Ho Y, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997 (cap. 1).
- [7] Kobarle P. *J. Mass Spectrom.* 2000; **35**: 804.
- [8] Enke CG. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 4885.
- [9] Ogorzalek Loo RR, Dales N, Andrews PC. *Protein Sci.* 1994; **3**: 1975.
- [10] Rundlett KL, Armstrong DW. *Anal. Chem.* 1996; **68**: 3493.
- [11] Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 625.
- [12] Sunner J, Nicol G, Kobarle P. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1300.

6. Reacções de uma lisina modificada com compostos α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos: um estudo de estrutura/actividade por espectrometria de massa de electrospray.

Na base do estudo, descrito no capítulo anterior, para o comportamento de soluções de dois componentes (analito + electrólito), está-se numa posição mais favorável para a análise das amostras das misturas reaccionais, dos compostos amina com os compostos α -dicarbonilo, por ESI-MS.

É de notar que nos sistemas de dois componentes referidos se verificou um aumento do sinal dos iões analito, no espectro de massa ESI, com a concentração do analito em solução, para soluções de analito, analisadas por ESI-MS, contendo uma concentração significativa de tampão HEPES. É, no entanto, mais provável que um possível aumento do sinal dos iões analito se reflecta nas soluções de analito contendo 10^{-3} M de tampão HEPES, em particular quando concentrações elevadas de analito estão presentes nas referidas soluções. Neste contexto, e tendo em consideração o suporte provido pelo modelo de partição de equilíbrio [1,2], em soluções contendo concentrações significativas de analito e de electrólito, um maior número de iões analito pode competir para o excesso de carga na superfície do líquido, uma vez que a concentração do excesso de carga pode ser extendida quando o número de espécies iónicas com afinidade para a superfície do líquido aumenta, no âmbito da análise ESI-MS. Este é o caso dos iões analito e dos iões electrólito, em particular dos iões electrólito estudados (iões do tampão HEPES), uma vez que possuem actividade superficial. Mesmo que os iões do tampão HEPES tenham uma grande tendência para o desenvolvimento do excesso de carga na superfície do líquido, os iões analito considerados, deverão ter uma afinidade equiparada à dos iões do tampão HEPES para a ocupação do excesso de carga na superfície líquido, pois os iões do tampão HEPES, possuindo natureza de electrólito, apresentam uma forte componente de solvatação, em semelhança com os iões analito. Em termos do comportamento do excesso de carga na superfície do líquido, é possível que a acumulação de iões do tampão HEPES na superfície do líquido conduza a um aumento da densidade iónica na superfície, resultando na formação de uma “camada compacta de iões” como fora estabelecido por Constantopoulos et al. [2], para soluções de analito contendo concentrações significativas de iões electrólito. Considerando que os iões analito podem ter uma

eficiência de ionização superior, face aos iões do tampão HEPES, é provável que esta camada compacta, assistida por iões do tampão HEPES, auxilia na desolvatação das espécies analito, para, assim, estas últimas poderem constituir-se como entidades individuais na fase gasosa. Nesta situação não são apenas importantes os efeitos ocorridos na superfície do líquido, como a concentração e actividade superficial das espécies iónicas, mas também as energias de solvatação dos iões, efeitos de polaridade e, em última análise, as correspondentes eficiências de transferência iónica. Não se sabe, porém, se o processo de evaporação dos iões analito à superfície do líquido (gota) é ou não favorecido, face a outros de tipos de eventos de decomposição das gotas carregadas, como a explosão Coulombica. Isto em consideração com a possível morosidade do processo de transferência dos iões analito, assistidos por uma camada compacta de iões de tampão HEPES e de analito, para a fase gasosa em ESI-MS.

Relativamente às soluções das misturas reaccionais, é possível, atendendo à baixa ordem de complexidade das mesmas, que não haja efeitos de supressão iónica significativos, uma vez que a concentração do excesso de carga na superfície pode ser estendida [2], embora haja também limites. Experiências preliminares, e experiências de monitorização das espécies iónicas detectadas (reagente amina e produtos de reacção), por análise ESI-MS das misturas reaccionais, revelaram resultados muito equivalentes aos obtidos para as soluções de dois componentes, em termos da magnitude das abundâncias relativas observadas, no espectro de massa ESI.

O facto das abundâncias relativas dos iões analito, observadas no espectro de massa ESI, em função da concentração do analito em solução (soluções de dois componentes), revelarem uma variação linear, em particular para concentrações de analito superiores a 10^{-5} M, e atendendo ao facto de se estar a considerar uma concentração de tampão HEPES de 10^{-3} M, é possível que as abundâncias iónicas dos iões analito detectados, no espectro de massa ESI das misturas reaccionais, variem consoante o tempo de reacção, podendo assim ser possível a monitorização dos sistemas reaccionais. Todavia, e em similaridade com o referido no capítulo anterior, devem ser mantidas algumas reservas neste contexto, pois é necessário atender à discriminação da razão massa/carga das espécies iónicas, na operação do espectrómetro de massa [3], e também ao facto de diferentes analitos possuírem diferentes eficiências de ionização face aos iões do tampão HEPES, no processo de conversão dos iões para a fase gasosa em ESI-MS. Assim sendo, é mais adequado a comparação das abundâncias relativas dos

iões analito, para analitos estruturalmente similares e, como tal, com razões massa/carga semelhantes, na investigação dos dois efeitos referidos atrás.

6.1. Objectivos.

No presente capítulo, estudou-se a reacção da lisina modificada, N_α -acetil-L-lisina (acetil-lisina), com α -dicarbonilos aldeídicos (glioxal, metilglioxal e fenilglioxal) e dicetónico (diacetil), por ESI-MS. O propósito deste estudo prende-se com (i) a identificação e a caracterização das espécies iónicas de interesse nas reacções da acetil-lisina, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa ESI, (ii) a comparação da informação obtida para os sistemas reaccionais em causa, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa ESI, com a informação disponível na literatura, em particular no que respeita à natureza estrutural dos compostos identificados em ESI-MS, (iii) o uso das abundâncias relativas dos iões de interesse observados, no espectro de massa ESI, em particular no estabelecimento de comparações entre a formação de compostos de interesse estruturalmente semelhantes, (iv) estabelecimento de pospostas mecanísticas para os sistemas reaccionais em causa, e sua comparação com as propostas mecanísticas existentes na literatura, (v) utilização da informação obtida, em termos da natureza estrutural dos compostos identificados e da mecanística proposta para os sistemas reaccionais em causa, de modo a auxiliar na compreensão dos processos de glicação relacionados.

Reactions of a modified lysine with aldehydic and diketonic dicarbonyl compounds: an electrospray mass spectrometry structure/activity study

Marco A. Saraiva,^{1,2} Carlos M. Borges^{1,2} and M. Helena Florêncio^{1,2*}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

² Center for Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

Received 7 July 2005; Accepted 1 November 2005

The phenomenon known as non-enzymatic glycation is described as the reaction of reducing sugars with basic amino groups of proteins and nucleic acids, as well as with simple amines, without enzyme mediation. Non-enzymatic model glycation reactions that make use of low-molecular-weight compounds make an important contribution in the elucidation of glicated processes *in vitro* and *in vivo*. Four α -dicarbonyl compounds, aldehydic (glyoxal, methylglyoxal and phenylglyoxal) and ketonic (diacetyl), were reacted with the modified amino acid N_α -acetyl-L-lysine (AcLys) in an attempt to establish structure/activity relationships for the reactivity of α -dicarbonyls with the amine compound. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) combined with tandem mass spectrometry (MS/MS) and collision-induced dissociation (CID) was used to identify and characterize reagents, intermediates and reaction products. The formation of dicarbonyl-derived lysine dimers was observed exclusively. Especially, attention is drawn to alkyl- (asymmetrical dicarbonyl systems) and carboxyl- (glyoxal system) substituted imidazolium ions, at ring position 2.

The main differences observed in the reactions studied were related to the reactivity with the diimine intermediate. This intermediate can react either with a non-hydrated dicarbonyl molecule at the aldehydic carbonyl, or with a mono-hydrated one at the ketonic carbonyl, particularly for asymmetrical dicarbonyls. For 2-carboxyl-substituted imidazolium ion (glyoxal reaction), besides the usual keto–enol rearrangement from the diol group, an alternative reaction pathway (proton abstraction) appears to contribute also for the imidazolium ring-closure process. Moreover, the formation of imidazolium ring structures can depend on several factors, namely, the presence (or absence) of electron donor substituents at the formed diol, the degree of stability of the new electrophile generated and/or the equilibrium concentration of the non- and mono-hydrated dicarbonyl forms in solution, the last being particularly important for asymmetrical dicarbonyls.

The results reported reveal the complexity of reactivity as well as the diversity of imidazolium molecular structures. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: non-enzymatic model glycation reactions; ESI-MS/tandem mass spectrometry; aldehydic and ketonic α -dicarbonyls; acetyl-lysine; imidazolium ions

INTRODUCTION

The Maillard reaction,¹ or non-enzymatic glycation, has a key role in the understanding of some pathogenesis resulting from diabetic complications and the ageing process. A number of important reports have been published on this subject in the past decade.^{2,3} In food chemistry also the Maillard reaction has a recognized importance.⁴ In a simplified way, the Maillard reaction can chemically be analysed in three stages. In the initial stage, there is a reversible formation of a Schiff base (unstable form) between a reducing sugar

and a protein amino group in equilibrium with the cyclic glycosamine form. This step is followed by a rearrangement, i.e. the Schiff base gives rise to an enamine form and subsequently to a relatively stable ketoamine compound (Amadori rearrangement). The Amadori compound is stabilized by its cyclization to a furanose or pyranose ring.² In the intermediate stage, the stable Amadori compound is degraded by a series of reactions to yield small molecules containing dicarbonyl groups, which are more reactive when compared with the starting sugar molecules. In the final stage, chemically irreversible as the preceding one, a wide variety of structurally diverse adducts, known as *advanced glycation end products* (AGEs) are formed. The AGE adducts have, frequently, chromophores, fluorophores and protein cross-links. AGEs can be distinguished in a number of aspects

*Correspondence to: M. Helena Florêncio, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal.
E-mail: mhflorencio@fc.ul.pt

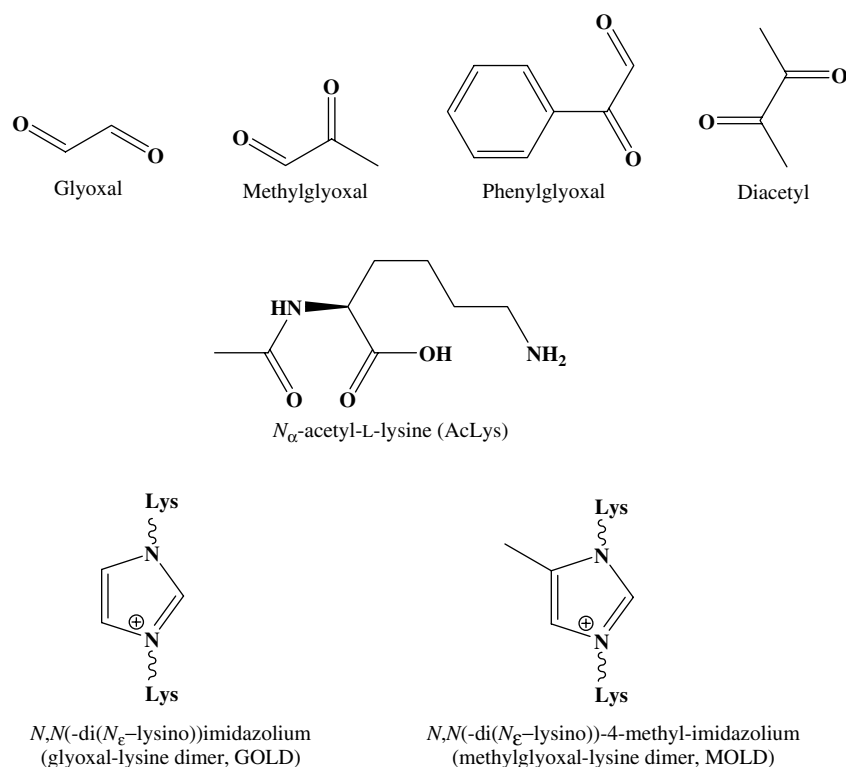


Figure 1. Chemical structures of α -dicarbonyls, acetyl-lysine (AcLys) and imidazolium ions GOLD and MOLD.

related to their biological and physiological functions: protein cross-links; recognition factors for specific AGE-binding cell-surface receptors; markers and risk predictors of disease processes.⁵ In the past few years, more than one dozen AGEs have been discovered. Some are related to diabetes and other pathologies, and their accumulation in tissue proteins, particularly in long-lived structural proteins such as collagen, fibronectin, tubulin, crystallin lens and myelin, has been observed. As a result of AGE formation, protein modification has been observed due to structure and functional changes. Furthermore, α -dicarbonyl compounds have been recognized as the major intermediates and/or precursors in AGE formation, *in vivo*. Recently, it has been proposed that α -dicarbonyl stress is among the major factors in the pathogenesis of diabetic complications.^{6–8} Glyoxal, methylglyoxal (MGO), 3-deoxyglucosone, and glucosone are the four reactive dicarbonyls that form the group of heterogeneous AGEs. The amine groups of the proteins, involved in the reaction towards sugars and/or dicarbonyls compounds, correspond to (1) *N*-terminal amino groups of the polypeptide chains, (2) the ϵ -amino groups of lysine residues and (3) guanidino groups in the arginine residue. The extent of glycation in physiological systems is very low, typically 0.01–1% of the lysine and arginine residues.⁹ Its recognized importance justifies, therefore, *in vitro* studies in which the extent of glycation can be improved.⁹ The glyoxal dicarbonyl is a highly reactive dicarbonyl and it is generated during the autooxidation of glucose and glyceraldehyde, as the major product observed. The oxidation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) involving formation of hydrogen peroxide and β -fragmentation also generate glyoxal.¹⁰ DNA oxidation seems also to produce this dicarbonyl.¹¹ Glyoxal

reacts with lysine, cysteine and arginine residues on proteins to form irreversible AGEs. N_α -(carboxymethyl)lysine (CML),^{12–14} glyoxal-lysine dimer (GOLD)^{15–17} (Fig. 1) and N_ϵ -(carboxymethyl)arginine (CMA)^{18,19} are good examples of glyoxal-derived AGEs. MGO, similar to glyoxal, is a by-product of glycolysis.²⁰ Minor routes such as PUFA²¹ degradation and acetone metabolism and catabolism of threonine also generate MGO.^{22,23} Other minor biochemical pathways for MGO formation are non-enzymatic β -elimination of phosphate from triose 3-phosphate intermediates, glyceraldehyde 3-phosphate and dihydroxyacetone phosphate.^{5,24} The main pathway for MGO production *in vivo* is unknown, since it is formed during both non-oxidative and oxidative chemistry.² Furthermore, MGO is a physiological substrate of the glutathione-dependent glyoxalase pathway, which catalyses the detoxification of MGO to D-lactate.^{25,26} This asymmetrical dicarbonyl reacts fast with amino, guanidino and thiol functional groups in proteins²⁷ and even with nucleic acids.²⁸ MGO is considerably more reactive than glucose (20000 times) and has the capability to disrupt metabolic functions including mitochondrial respiration and glycolysis.^{29,30} A number of important MGO-derived AGEs are reported in the literature, e.g. the hydroimidazolones (and isomers),⁹ argpyrimidine,³¹ tetrahydropyrimidine (THP)⁷ and MGO-lysine dimer (MOLD) (Fig. 1).¹⁶

In an effort to elucidate the complex Maillard reaction and to access AGEs, reaction models with low-molecular-weight compounds have been studied. These models are based on the reaction of simple amine compounds, modified amino acids (and similar compounds) and peptides with dicarbonyl compounds and even with sugars (and derivatives). In the past two decades, this approach has been systematically

undertaken, especially in food chemistry.³² Since dicarbonyl compounds are among the most important intermediates in the Maillard reaction, the reactivity towards the amino compound *N*_α-acetyl-L-Lysine (AcLys) of four dicarbonyl molecules, aldehydic (glyoxal, MGO and phenylglyoxal), diketonic (diacetyl) (Fig. 1), and their different forms in solution, hydrated and non-hydrated, were investigated in our study. The proposed study attempts also to establish a relationship between the structure of the dicarbonyl and its ability to react with the amino compound AcLys. This is an aspect that has not been systematically explored from the chemical point of view. Moreover, some considerations on the electrophilic character of the dicarbonyl molecules are also reported. Results from another study,³³ involving the same dicarbonyl molecules but with modified arginine, have been taken into account in the current investigation.

Recently, mass spectrometry has been used for protein glycation and cross-linking research owing to its high sensitivity and specificity.^{34–36} Electrospray ionization (ESI) and ion trap mass spectrometry techniques were used as the methods for our investigation on the non-enzymatic reactions of AcLys with the four dicarbonyls. To identify as well as to elucidate the structural aspects of the unknown compound ions formed in those reactions, ESI was combined with tandem mass spectrometry (MS/MS) and collision-induced dissociation (CID).

EXPERIMENTAL

Materials

The dicarbonyls, glyoxal, phenylglyoxal and diacetyl, the modified amino acids AcLys and AcArg, the sulfonic buffers, HEPES (sodium salt), MOPS and the MGO precursor, methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal, were purchased from Sigma. In the preparation of the reaction mixtures, ultrapure water (18.4 MΩ.ms) was used, produced in a Wasserlab G. R. apparatus. Saturated solutions of sodium- and potassium hydroxide, NaOH and KOH, respectively, (solid pellets both from Merck) and/or a concentrated solution of hydrochloric acid, HCl (Riedel-de Haën), were used to adjust the pH of the reaction solutions and to prepare the sulfonic buffer solutions.

MGO synthesis via methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal acid hydrolysis

The commercially available MGO solution (40% in water) was not adequate, since it was contaminated mainly with formaldehyde (30% in the solution), as well as with other impurities such as pyruvate, lactate and formate.³⁷ For this reason, MGO was synthesized following a method described by Kellum *et al.*³⁸ This method follows its preparation from methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal precursor by acid hydrolysis. Experimentally, a mixture containing 2500 µl of sulfuric acid, H₂SO₄, 1/10 (v/v) in millipore water, 2300 µl of millipore water and 200 µl of methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal was heated in a water bath and kept boiling for 25 min. The resulting pale yellow mixture was cooled and kept in ice water until use. For confirmation purposes, the hydrolysed mixture was distilled, and the MGO yield was ca 50%. This compound was identified and characterized by gas

chromatography/mass spectrometry (GC-MS). Moreover, in other experiments, organic layers of the hydrolysed mixture were analysed by GC-MS and revealed that pyruvate is a possible contaminant, although to a lesser extent, in comparison with MGO.³⁷

Preparation and incubation of the reaction mixtures

The experiments were initially performed at 30 °C. The continuous detection of many intermediates and products in the course of several weeks stimulated us to increase the temperature up to 70 °C. Experimentally, 1 ml of the buffer solution (200 mM) at pH 7.5, previously prepared, was added to 1 ml of the aqueous solution of the modified amino acid AcArg (100 mM). To this mixture was also added, separately, 1 ml of the aqueous solution of the dicarbonyls glyoxal, MGO, phenylglyoxal and diacetyl (100 mM) up to a total volume of 3 ml. After adding the dicarbonyl compounds, the solutions were maintained incubated at 70 °C in a stove (Memmert, model 1500) with air circulation for 28 days. Further details concerning the incubation procedure at the latter temperature are presented in the Appendix. For MGO and diacetyl reaction systems only, the reaction was initiated at room temperature (r.t.) and kept at 70 °C immediately afterwards. At previously selected fixed time intervals, aliquots of 100 µl were taken and kept at –80 °C immediately. In order to exclude ions derived from the reaction and/or interaction with the buffer compound, HEPES, incubations with the amine compound and the four dicarbonyls using this buffer were conducted individually at the same temperature and pH. The buffer HEPES has been used throughout our studies. Nevertheless, for confirmation purposes, the buffer system MOPS–KOH has also been used, where necessary. Both buffer systems HEPES and MOPS–KOH are convenient because they are temperature resistant, which is important for the reaction conditions used. They have also minimum salt effects and form no complexes with metal ions.^{39,40} In addition, when the buffer HEPES was used, the ionization/desolvation mass spectrometry process for the reaction systems studied was found to improve.

Methods

Methylglyoxal identification and characterization was performed on a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, GC-MS system, Fisons GC 8000 Series, coupled to a mass detector Trio 1000; column Rtx-4Sil MS 30 m × 0.25 mm; i.d. 0.25 µm; carrier gas – helium at 100 psi.

Mass spectrometry experiments were also performed on a LCQduo (Finnigan, San Jose, CA, USA) ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ion source, maintained at 4.5 kV. The coaxial sheath gas (nitrogen) flow rate was ca 20 psi, with an auxiliary gas (nitrogen) flow rate of 20 psi. The capillary was kept at ca 10 V and it was also maintained heated at 220 °C. The pressure, measured with the convectron gauge during electrospray experiments, was normally 0.92 Torr. The base pressure in the ion trap with helium was ca 1.12×10^{-5} Torr. To obtain ESI mass spectra, the samples were diluted 200 times in Millipore water and infused directly into the ESI source at a flow rate of 5 µl/min.

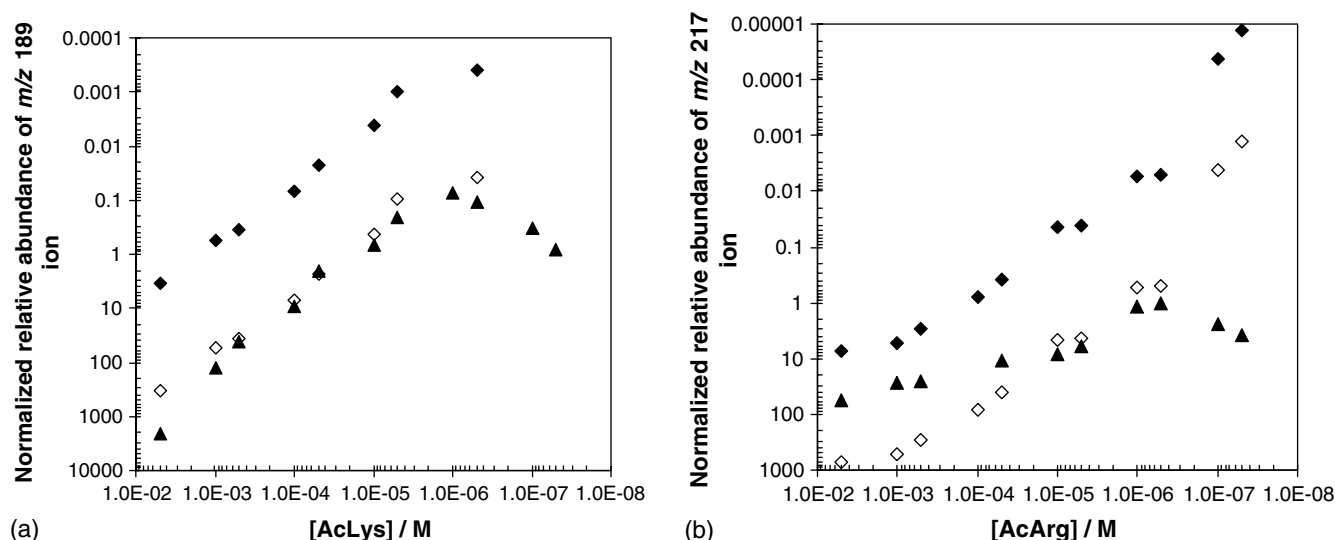


Figure 2. Relative abundance of the modified amino acid protonated molecules, AcLys and AcArg, observed in the ESI mass spectra, normalized with respect to m/z 261 ions (most prominent buffer ion in the ESI mass spectra) as a function of solution concentration: (a) \blacklozenge m/z 189 ion (AcLys protonated molecule) (buffer solution concentration 10^{-3} M); \blacktriangle m/z 189 ion (buffer solution concentration 10^{-5} M); \diamond predicted variation for m/z 189 ions, accounting for the different buffer solution concentrations used; (b) \blacklozenge m/z 217 ion (AcArg protonated molecule) (buffer solution concentration 10^{-3} M); \blacktriangle m/z 217 ion (buffer solution concentration 10^{-5} M); \diamond predicted variation for m/z 217 ions, accounting for the different buffer solution concentrations used. ESI-MS operating conditions are as stated in the Experimental section.

Experiments were carried out in the positive ion mode and full scans were recorded in the mass range m/z 50–1000. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 50 ms (default values).

In the ESI-MS/MS and CID experiments, the ions were isolated in the ion trap by the development of appropriate voltages in the different lens segments of the instrument. The ions, especially M^+ , were forced to collide with helium gas retained in the ion trap segment of the apparatus. For the excitation of the ionic species, 20–50% of the maximum available collision energy was applied. This energy value was selected in order to ensure that the precursor ions could be observed in the ESI-MS/MS spectra, i.e. a remaining relative peak intensity of about of 1–5% for precursor ions was achieved. The total ion current was above 5×10^3 in all cases.

Reactions systems and ESI-MS analysis were performed in duplicate. ESI-MS/MS spectra were repeated two to three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Buffer behaviour (HEPES)

The ESI mass spectra (not shown) of the reactions of the amino compound AcLys and of the single component solutions with the dicarbonyls revealed that no significant interaction with the buffer occurred. Nevertheless, to study the effect of the analyte ion signal suppression in non-volatile buffered solutions and for the purpose of comparison with AcLys, experiments using AcArg (an amino acid having also a basic side chain and a similar magnitude of the physical properties such as polarity, hydrophobicity and media bulkiness) have been performed. The abundance of the m/z 261 buffer ion in the ESI spectra of all reaction

systems studied also did not change significantly with reaction time. For this reason, m/z 261 ions were used as the standard. Measurements were based on the ratio between the relative ion abundance of m/z 261 ions and the total ion current (TIC) of the corresponding mass spectra (results not shown). Several aspects regarding the use of the buffer HEPES in the present study should also be pointed out: (1) The buffer ions do not seem to suppress the protonated molecules of AcLys and AcArg in experiments conducted individually. The relative abundances of protonated amino acid molecules plotted as a function of m/z 261 buffer ions at two different buffer concentrations (10^{-5} and 10^{-3} M) are shown in Fig. 2. (2) A linear relationship between the amino acid concentration in solution and the corresponding normalized relative abundances of protonated molecules in the ESI mass spectra (range: 5×10^{-6} – 5×10^{-3} M for the protonated AcLys molecule and 5×10^{-8} – 10^{-4} M for the protonated AcArg molecule) is observed (Fig. 2). Moreover, the solution pH also did not change significantly; the buffer may possess electrolyte behaviour, levelling the total ionic current. (3) Stabilization of the reaction pH occurs, an important factor for the maintenance of the ion signal stability considering that some of the molecules can easily be protonated in solution.

Behaviour of the dicarbonyl reaction systems under ESI mass spectrometry

Four reaction systems were studied in this investigation, i.e. the reactions of the modified amino acid AcLys with the dicarbonyls glyoxal, MGO, diacetyl and phenylglyoxal. At selected fixed reaction times, aliquots were recovered, and the ESI mass spectra obtained (not shown) exhibit several M^+ ions and one $[M + H]^+$ ion, with very little/no fragmentation. As an example, the ESI mass spectra of

aliquots of MGO reaction system solutions are presented in Fig. 3. The M^+ ions correspond to: simple imidazolium ions at m/z 411 (glyoxal), 425 (MGO), 487 (phenylglyoxal) and 453 (diacetyl), ion 2; 2-alkyl-substituted imidazolium ions at m/z 439 (MGO) and 563 (phenylglyoxal), ions 3; 2-carboxyl-substituted imidazolium ion at m/z 455 (glyoxal), ions 4. The $[M + H]^+$ ion corresponds to a substituted dihydro-1,4-diazepine ion at m/z 497 (MGO), ion 5. All M^+ and $[M + H]^+$ ions are referred to in Table 1, and their relative abundances were determined at two different reaction times. Together with these ions, dicarbonyl-derived lysine dimer adduct ions with sodium and potassium atoms are also included in Table 1. In most cases, the relative abundance of the identified ions (reaction products) was less than 10%. This observation can be attributed to a suppression effect by the buffer ions. It must however be emphasized that the TIC obtained in the ESI spectra was, in general, *ca* 10^7 . Moreover, the amine compound AcLys was found to react at different rates with the four dicarbonyls. In general, phenylglyoxal and glyoxal appear to react more slowly, whereas MGO and diacetyl react much faster, accounting for the lower relative abundance of m/z 189 ion, as can be observed in Table 1 for AcLys protonated molecule, when comparing relative intensities and corresponding reaction times. Furthermore, and despite the rapid reaction of the AcLys compound with MGO and diacetyl dicarbonyls, in less than 4 h of incubation, some of the ions of interest were found to be diminished in their relative abundances, e.g. m/z 439 ions in the MGO reaction (Fig. 3 and Table 1).

Identification and characterization of reaction products

On the basis of ESI-MS/MS and CID analysis (not shown), ion structures for the ions 2–5 (Table 1) are proposed and depicted in Table 2. These ion structures are consistent with the fragment ion composition, depicted in Tables 3 and 4. All intermediate/product ions identified were found to possess the dicarbonyl-derived lysine dimer-type molecular

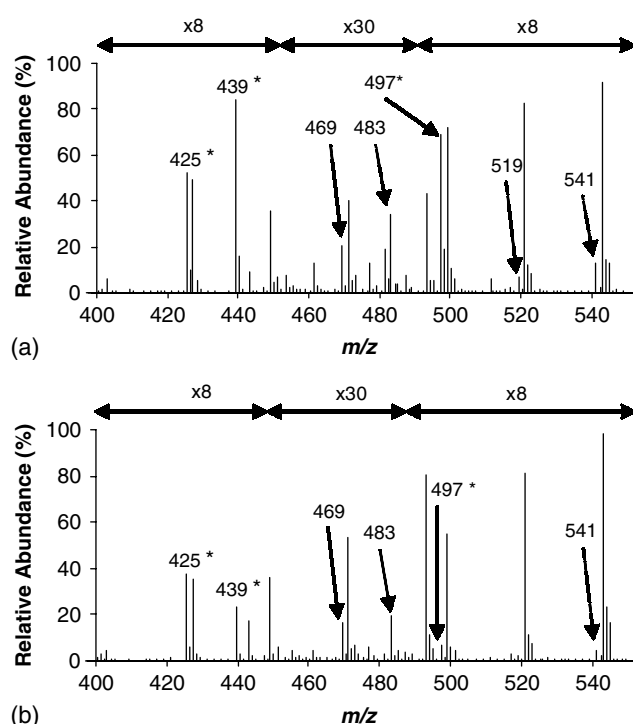


Figure 3. ESI mass spectra of aliquots of MGO reaction system solutions: (a) 30 min and (b) 240 min. * Denotes the ions of interest. All other ions assigned in the spectra refer to imidazolium adduct ions with sodium. The m/z 261 ion (buffer HEPES) is the base peak of the spectra.

structure, also consistent with the literature reports for imidazolium compounds GOLD and MOLD.^{15,16}

The ions at m/z 411, 425, 487 and 453 (ions 2), for glyoxal, MGO, phenylglyoxal and diacetyl reaction systems, respectively, (Tables 3 and 4) were found to possess the same fragmentation pattern, namely, with losses from the carboxyl group, amide group and part of the side chain of the modified amino acid, AcLys (Tables 3 and 4). These losses can be attributed to water, to the protective acetyl

Table 1. Identified ions based on ESI-MS analysis and their normalized relative abundances at different reaction times

Compounds of interest	Reactions systems (acetyl-lysine (AcLys) with glyoxal, MGO, phenylglyoxal and diacetyl) m/z (M^+ or $[M + H]^+$) (Rel. abundance (%))			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Diacetyl
AcLys (1)	189 (46.7 ^a ; 27.5 ^b)	189 (29.9 ^a ; 31.5 ^c)	189 (61.2 ^a ; 26.0 ^d)	189 (42.4 ^a ; 40.9 ^e)
$[M]^+$ (2) (Simple imidazolium ions)	411 (3.1; 16.1)	425 (6.6; 4.7)	487 (17.1; 198.4)	453 (0.6; 1.1)
$[M]^+$ (3) (2-Alkyl-substituted imidazolium ions)	f	439 (10.5; 2.9)	563 (–; 6.3)	f
$[M]^+$ (4) (2-Carboxyl-substituted imidazolium ion)	455 (29.5 ^{g,h} ; –)	f	f	f
$[M + H]^+$ (5) (Substituted dihydro-1,4-diazepine)	f	497 (8.8; 0.9)	f	f
$[M - H + Na]^+$ (2a)/ $[M - 2H + 2Na]^+$ (2b)	433/487 ^h	– /469	509/531	f
$[M - H + Na]^+$ (3a)/ $[M - 2H + 2Na]^+$ (3b)	f	– /483	585/–	f
$[M + Na]^+$ (5a)/ $[M - H + 2Na]^+$ (5b)	f	519/541	f	f

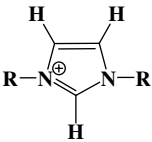
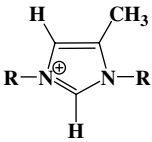
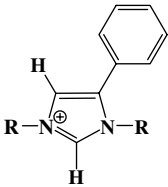
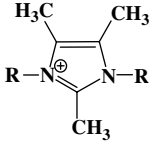
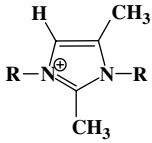
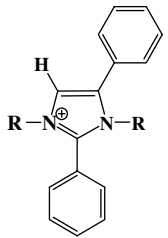
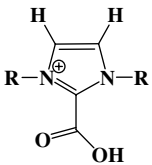
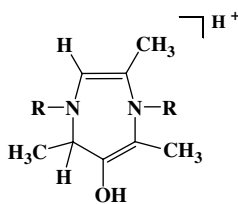
Reaction times: ^a 30 min; ^b 7 days; ^c 240 min; ^d 14 days; ^e 120 min; ^f Not applicable; ^g 60 min.

Relative abundances normalized to the m/z 261 HEPES buffer ion.

^h Ion obtained from different reaction conditions: MOPS-KOH buffer system. The last three lines of the Table refer to adduct ions with sodium (or potassium) atoms identified in the ESI mass spectra.

– Not detected.

Table 2. Proposed ion structures for the ions **2–5**, mentioned in Table 1

Ions of interest	Reaction systems (AcLys with glyoxal, MGO, phenylglyoxal and diacetyl) Possible ion structures			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Diacetyl
2	 (<i>m/z</i> 411)	 (<i>m/z</i> 425)	 (<i>m/z</i> 487)	 (<i>m/z</i> 453)
3	—	 (<i>m/z</i> 439)	 (<i>m/z</i> 563)	—
4	 (<i>m/z</i> 455)	—	—	—
5	—	 (<i>m/z</i> 497)	—	—

R = C(COOH)(NHCOCH₃)(CH₂)₄. — Not detected.

group (42 Da loss), to CO₂ (44 Da loss) and, to a greater extent, to the complete side chain of the AcLys compound. The common loss of 171 Da (Tables 3 and 4) is an example of the latter. Such a 171-Da loss, also observed in the imidazolium ions GOLD and MOLD MS/MS spectra, is consistent with literature reports^{41,42} and accounts for the presence of the acetal protective group in the product ions formed in the present case. MS/MS data of triosidine compounds which are formed in the reaction of AcLys with glyceraldehyde revealed equivalent losses from the modified amino acid residue. These losses refer to H₂O, acetyl (42Da), acetyl + CO + H₂O (88 Da), acetyl + NH₃ + CO + H₂O (105 Da) and acetyl-norleucine (171 Da).⁴³ The simple imidazolium ions, ions **2**, at *m/z* 411, 425, 487 and 453 for glyoxal, MGO, phenylglyoxal and diacetyl reaction systems, respectively, exhibit a similar fragmentation trend with respect to the main fragmentation pathways (leading to abundant fragment ions) as the one observed for the AcLys protonated molecule (Table 3). A second loss of 171 Da and the subsequent release of the imidazolium ring

are encountered only for the phenylglyoxal reaction system (Table 4). Furthermore, the relative abundance of the *m/z* 487 ion was significantly higher, when compared to *m/z* 425 ions abundance, corresponding to simple imidazolium ions, ions **2**, of MGO and phenylglyoxal reaction systems, respectively (Table 1). Note that the *m/z* 487 ion was found to be the base peak in the ESI spectrum after the first 7 h of reaction. Interestingly, 2-alkyl-substituted imidazolium ions, ions **3**, at *m/z* 439 (MGO) and 563 (phenylglyoxal) (Table 1), with a fragmentation pattern (Table 4) similar to the one of ions **2** for the corresponding MGO and phenylglyoxal reaction systems (Table 3), were also observed for the asymmetrical dicarbonyls reaction systems. The *m/z* 439 (MGO) and *m/z* 563 (phenylglyoxal) ions, however, may possess, in comparison with ions **2**, a methyl and a phenyl substituent group, respectively. Although not reported in the literature, for the MGO reaction system, the *m/z* 439 ion was found to have a higher relative abundance, when compared to the one of the *m/z* 425 ion of the acetylated MOLD compound, an important AGE.

Table 3. Relative abundances (%) of fragment ions, derived from the precursor ions identified in the ESI mass spectra of glyoxal and diacetyl reaction systems (ions **1**, **2** and **4** mentioned in Table 1)

Fragment ion composition	<i>m/z</i> (Precursor ion)					
	189 ^a	211 ^b	411;453	455; ^c –	433; ^d 475	487; ^{c,e} –
[M – NH ₃] ⁺	9.7	–	–	–	–	–
[M – H ₂ O] ⁺ ^f	100	1.1	61.7; 36.7	68.0 ^g ; –	54.9; 30.1	1.1; –
[M – H ₂ O – CH ₂ CO] ⁺	98.2	100	11.6; 4.1	–	35.3; 30.8	–
[M – H ₂ O – CO ₂] ⁺	–	–	9.1; 15.9	–	30.3; 21.9	–
[M – CH ₂ CO] ⁺ ^f	6.1	–	100; 100	–	16.9; 12.5	1.9; –
[M – CO ₂] ⁺	–	–	60.7; 82.2	100 ^g ; –	1.6; 5.9	–
[M – H ₂ O – CO] ⁺	–	–	20.2; 31.3	–	2.0; 1.5	–
[M – CH ₂ CO – CO – H ₂ O] ⁺ ^f	1.7	–	–	–	12.1; 7.1	–
[M – NaC ₂ H ₅ NO] ⁺	h	–	h	h	100; 100	h
[M – NaC ₂ H ₅ NO – CO] ⁺	h	–	h	h	1.4; 4.5	h
[M – 104] ⁺ •	–	–	–	–	2.0; 8.0	–
[M – CH ₂ CO – NH ₃ – CO – H ₂ O] ⁺ ^f	5.8	–	–	–	1.8; 6.4	–
[M – 106] ⁺ •	–	–	1.7; 1.2	–	–	–
[M – 171] ⁺ ^f	–	–	37.1; 7.4	–	30.0; 6.4	100; –
[M – 171 – H ₂ O] ⁺	h	h	–	–	2.6; –	–
[M – 171 – CO ₂] ⁺	h	h	4.5; 1.8	–	–	–
[M – 171 – H ₂ O – CO ₂] ⁺	h	h	–	–	0.8; –	–

^{a,b} AcLys protonated molecule and AcLys sodiated molecule, respectively.^c Ion obtained using the buffer system MOPS-KOH.^d Imidazolium adduct ion with one sodium atom (**2a**) (Table 1).^e Imidazolium adduct ion with two potassium atoms (**2b**) (Table 1).^f Losses also observed from acetyl-trihydroxy-triosidine and acetyl-triosidine-carbaldehyde protonated molecules, having one acetyl-lysine residue in the ion structure (Ref. 43).^g Relative abundances of fragment ions, derived from the imidazolium ring, instead of the amino acid residue, as usual.^h Not applicable.

– Not detected.

104, 106 and 171 Da losses refer to C₃H₆O₃N, C₃H₈O₃N and C₈H₁₃O₃N (acetyl-norleucine) residues, respectively.

Experiments performed with the buffer system MOPS–KOH confirmed the above-mentioned observation. An ion at *m/z* 455 was observed in the ESI mass spectra of the glyoxal reaction system (Table 3). This ion remained present independently of the buffer system used. Its fragmentation pattern showed prominent losses of H₂O and CO₂. Such a fragmentation pattern differs from the one observed for simple- and 2-alkyl-substituted imidazolium, parent ions **2** and **3**, respectively (Tables 3 and 4). This fragmentation can be attributed to the presence of a carboxyl group in the imidazolium ring. Note that when the buffer used is HEPES, the ion at *m/z* 455 has a main contribution from the doubly sodiated moiety. Furthermore, the *m/z* 455 ion relative abundance of 29.5% (Table 1) in the first hour of reaction decreased during the first day of incubation (MOPS–KOH buffer system). In the ESI mass spectra (not shown) of the MGO reaction system, a substituted dihydro-1,4-diazepine ion at *m/z* 497, ion **5**, was observed (Table 1). This ion appears to be one of the most prominent ions of interest detected in the ESI spectra of the MGO reaction system, especially in the first 2 h of incubation (Table 1). The fragment ions from the substituted dihydro-1,4-diazepine parent ion of MGO reaction system are shown in Table 4. This ion results from a fragmentation similar to the one occurring for precursor

ions **2** and **3** (Tables 3 and 4). A possible ion structure for *m/z* 497 ions may therefore be a lysine dimer with a 1,4-diazepine ring (seven-membered ring) (Table 2), instead of the five-membered imidazolium ring ions structures described for ions **2**, **3** and **4** (Table 2). Indeed, the formation of a 1,4-diazepine ring involves a more stable dicarbonyl-derived reaction intermediate which is known to react with arginine residues, particularly in the formation of the argpyrimidine compound.^{31,44} Moreover, the fragment ions resulting from *m/z* 497 (Table 4) are consistent with stable pyrimidine ring structures (argpyrimidine). In addition, this proposal (substituted dihydro-1,4-diazepine ion) is consistent with the fragment ion composition that we observed for argpyrimidine molecule, an analogue of the *m/z* 497 ion, namely, with losses from the amino acid residue of the modified amino acid (unpublished results).³³

Besides all the identified ions mentioned above, adducts ions with sodium and potassium have also been observed in the reactions with both buffer systems HEPES–HCl and MOPS–KOH, with the exception of 2-carboxyl-substituted imidazolium ion, ion **4**. In Table 4, an example of *m/z* 487 imidazolium adduct ions with one and two sodium atoms, i.e. *m/z* 509 and 531 ions, respectively, is presented. Adduct ions with one and two sodium (or potassium) atoms were

Table 4. Relative abundances (%) of fragment ions, derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra, of MGO and phenylglyoxal reaction systems (ions **2**, **3** and **5**, mentioned in Table 1)

Fragment ion composition	Relative ion abundances (%)				
	<i>m/z</i> (precursor ion MGO; phenylglyoxal)				
	425; 487	439; 563	497; –	–; 509 ^a	–; 531 ^b
[M – H ₂ O] ⁺ ^c	46.6; 48.3	37.5; 35.3	52.6; –	– 37.3	–; 12.0
[M – H ₂ O – CH ₂ CO] ⁺	3.4; 8.2	2.0; 2.1	7.5; –	–; 29.3	–
[M – H ₂ O – CO ₂] ⁺	3.8; 11.1	13.5; 6.8	12.3; –	–; 26.9	–
[M – CH ₂ CO] ⁺ ^c	100; 100	100; 99.6	100; –	–; 18.3	–; 7.5
[M – CO ₂] ⁺	58.8; 71.6	76.1; 100	75.4; –	–; 5.5	–; 7.8
[M – H ₂ O – CO] ⁺	7.5; 22.4	18.5; 22.3	28.9; –	–; 5.1	–
[M – CH ₂ CO – CO – H ₂ O] ⁺ ^c	19.7; 36.3	27.7; 32.1	38.1; –	–; 16.2	–
[M – NaC ₂ H ₅ NO] ⁺	^d	^d	^d	–; 100	–
[M – NaC ₂ H ₅ NO – CO] ⁺	^d	^d	^d	–; 6.8	–
[M – 104] ⁺ [•]	0.5; –	–	–	–; 10.0	–
[M – CH ₂ CO – NH ₃ – CO – H ₂ O] ⁺ ^c	–	–	–	–; 7.0	–
[M – 106] ⁺ [•]	–	0.5; –	0.8; –	–; 0.5	–
[M – 171] ⁺ ^c	8.9; 43.0	9.8; 57.1	33.8; –	–; 29.2	–; 100
[M – 171 – H ₂ O] ⁺	–	–	9.2; –	–; 5.0	–
[M – 171 – CO ₂] ⁺	–; 4.6	1.0; 4.7	1.8; –	–	–
[M – 171 – H ₂ O – CO ₂] ⁺	–	–	0.7; –	–; 1.2	–
[M – 2*171] ⁺	–	–; 0.6	–	–	–

^{a,b} Imidazolium adduct ions with one (**2a**) (Table 1) and two (**2b**) (Table 1) sodium atoms, respectively.

^c Losses also observed from acetyl-trihydroxy-trisidine and acetyl-trisidine-carbaldehyde protonated molecules, having one acetyl-lysine residue in the ion structure (Ref. 43).

^d Not applicable.

– Not detected.

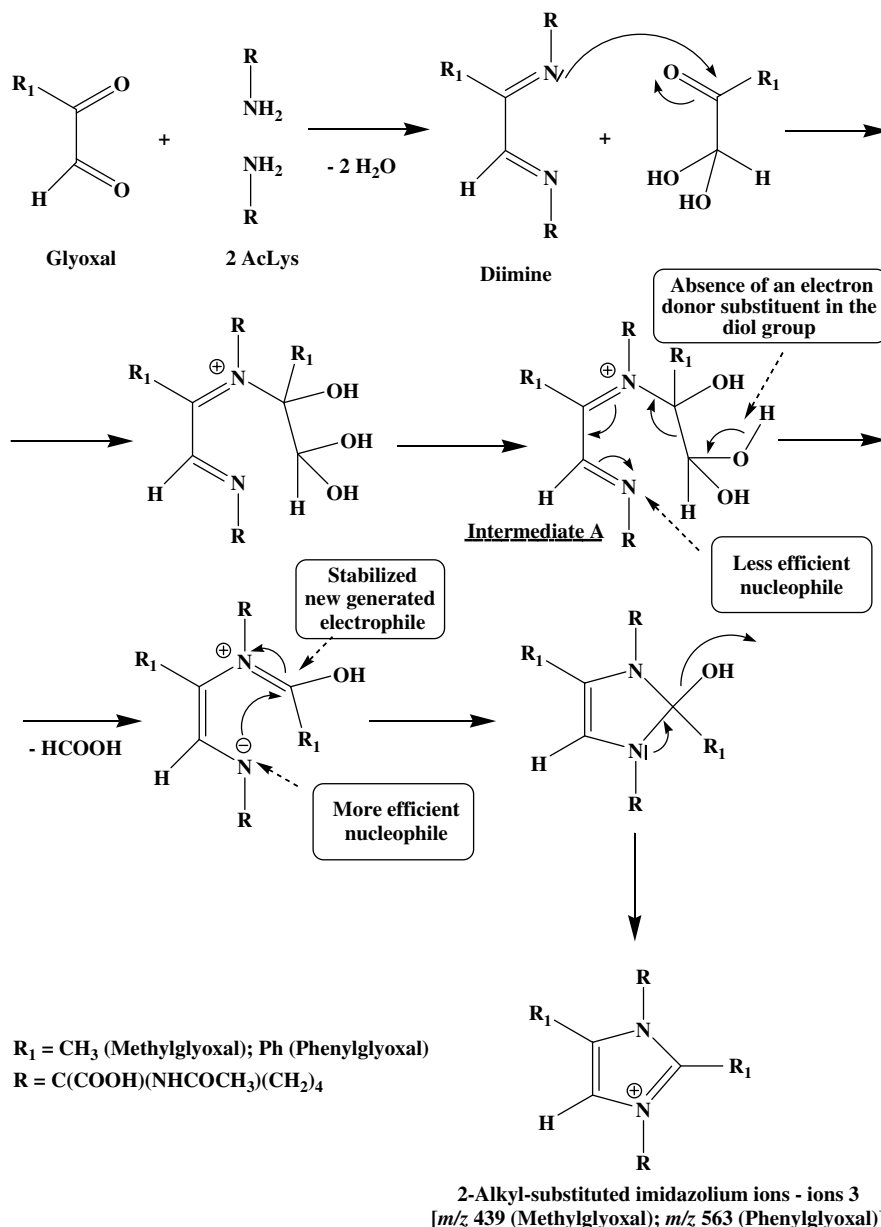
104, 106 and 171 Da losses refer to C₃H₆O₃N, C₃H₈O₃N and C₈H₁₃O₃N (acetyl-norleucine) residues, respectively.

observed for the most abundant ions at *m/z* 411 (glyoxal), 497 (MGO) and 487 (phenylglyoxal). These ions, besides having a fragmentation similar to imidazolium ions, exhibit the loss of NaC₂H₃O₂ (82 Da), assigned to adduct ions with one sodium atom, and confirmed by a similar prominent loss of KC₂H₃O₂ (98 Da) from adduct ions with one potassium atom. Further confirmation is given by the adduct ions in the MS/MS spectra with two sodium (or potassium) atoms, which also shows an abundant loss of 171 Da, this being characteristic of precursor ions that do not interact with sodium and potassium. Since metal cations (Na⁺ or K⁺) can interact individually with the two carboxylic groups of lysine residues in the charge/proton transfer processes, such a phenomenon may account for this observation.

Role of the dicarbonyl forms and their hydration equilibria in the reaction with AcLys – mechanistic considerations

MGO exists in aqueous solution in three major forms: non-, mono- and di-hydrated. These forms are in dynamic equilibrium in the approximate ratio of 1:71:28. The MGO non-hydrated form is more reactive than the mono-hydrated one, although the latter is present at a much higher concentration in equilibrium.^{37,45} Phenylglyoxal behaves similarly, although its extent of reactivity, with respect to the mono-hydrated form, is less pronounced than in mono-hydrated MGO forms. It should therefore be expected that the diimine intermediate, involved in the formation of

imidazolium ring structures, would react more easily with the ketonic carbonyl in a MGO mono-hydrated dicarbonyl form than in a phenylglyoxal mono-hydrated one. This situation is indeed observed, since formation of 2-alkyl-substituted imidazolium ions, ions **3**, occurs exclusively for asymmetrical dicarbonyl reaction systems. The mechanism of formation proposed for these ions **3** (Scheme 1) is similar to the mechanism reported for simple imidazolium ions MOLD and GOLD.^{15,16} The fact that the ion at *m/z* 439 (MGO), ion **3** (Table 1), possesses a higher relative abundance, at least in the first 4 h of reaction, when compared with the relative abundance of the ion at *m/z* 425 (MGO), ion **2**, may justify the more favoured reaction of the diimine intermediate with the mono-hydrated MGO dicarbonyl form. It can also be observed that the abundance of phenylglyoxal simple imidazolium ions, ions **2**, (Table 1) rapidly increases, whereas phenylglyoxal ions **3** are observed after a period of several weeks. We believe that these aspects contribute to confirm the importance of the mono-hydrated dicarbonyl MGO and phenylglyoxal forms in solution and also their dynamic equilibrium concentrations in the formation of the imidazolium ions. The analysis of the mechanism of formation of ions **3** (Scheme 1), together with literature reports for non-acetylated ions **2** formation, suggests that two important factors are involved in the formation of the imidazolium ring structures. One is the presence (or absence) of electron substituents in the diol group, which



Scheme 1. Proposed reaction mechanism for the 2-alkyl-substituted imidazolium ions formation, ions **3**, in both MGO and phenylglyoxal reaction systems.

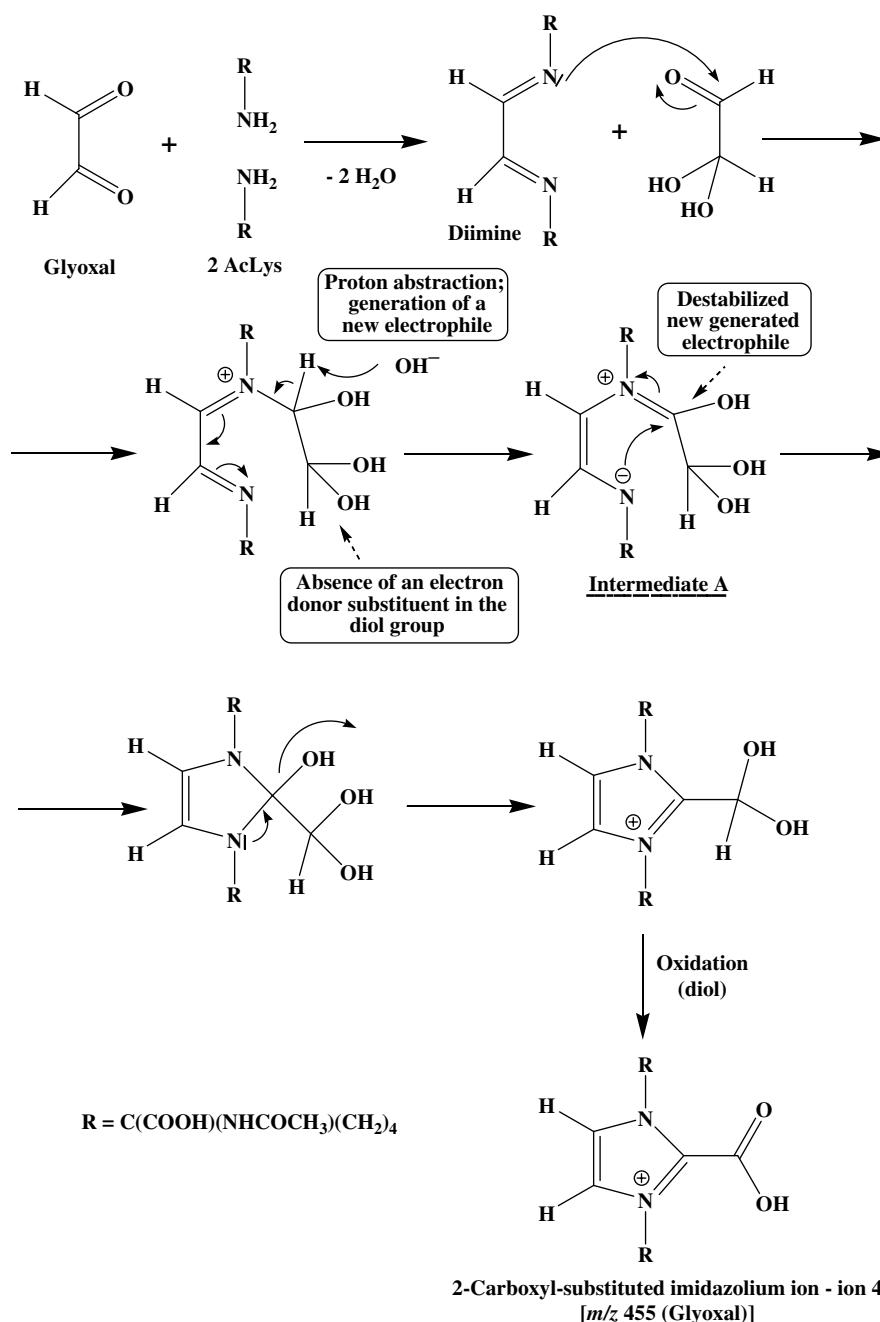
can favour (or not) carboxylic acid release. The other is the degree of stability of the newly generated electrophile. For the latter, less stabilization favours the nucleophilic attack by the reinforced nucleophile (N atom available in the diimine intermediate) (intermediate A – Scheme 1). It should, however, be emphasized that the keto–enol rearrangement in the diol group controls the process of the new electrophile generation. The latter is in turn responsible for the imidazolium ring closure and the extent of its formation depends on the strength of the nucleophile. For the simple imidazolium ions, ions **2**, and for asymmetrical dicarbonyls, both mentioned processes, i.e. the presence of electron donor substituents to promote carboxylic acid release and the stabilization of the newly generated electrophile, seem to favour the formation of the imidazolium ring. For the 2-alkyl-substituted imidazolium ions, ions **3**, (Table 1) none of these processes, absence

of electron donor substituents in the diol group and stabilization of the newly generated electrophile, seem to significantly contribute to the formation of the imidazolium ring. In this case, the magnitude of these two processes for imidazolium ring formation seem to compensate each other, and hardly any modifications are observed in the reaction mechanism. Another aspect that should be considered in the formation of ions **3**, which seems to be an important feature, is the equilibrium concentration of the mono-hydrated dicarbonyl forms involved.

With respect to the glyoxal reaction system, it should be taken into consideration that glyoxal is highly hydrated in aqueous solution and exists as *ca* 0.005% non-hydrated form, *ca* 0.5% mono-hydrated form, *ca* 1–2% as dimers and the remainder as di-hydrated.⁴⁵ The rapid formation of the m/z 411 ion (ion **2** – glyoxal; Table 1) can be explained by the consumption of the non-hydrated glyoxal form, i.e. its

most reactive form. The hydration equilibrium is, therefore, displaced from the di-hydrated form to the non- and mono-hydrated glyoxal forms. The formation of the carboxyl-substituted imidazolium ion (ion 4 – m/z 455), along with the formation of the simple imidazolium ion, ion 2, is attributed to the fact that, although depending on the equilibrium concentration of non- and di-hydrated glyoxal forms, mono-hydrated glyoxal forms should also be available in solution. The fact that 2-carboxyl-substituted imidazolium ions, ion 4, appear in the beginning of the reaction and disappear rapidly in the first day of the reaction (MOPS–KOH buffer system) (results not shown) seems to reinforce this assumption. The appearance of the mono-hydrated form in the beginning of the incubation and its reaction with the diimine intermediate

seem also to be consistent with this assumption, since once formed, it can rapidly be consumed by displacement of the hydration equilibrium towards the non-hydrated form (short life-time form). Furthermore, a comparison of the formation of simple imidazolium ions and 2-carboxyl-substituted imidazolium ion reaction mechanisms, ions 2 and 4, respectively (Scheme 2), reveals that no carboxylic acid release is observed in the latter. Furthermore, the diol group and $C\alpha$ hydrogen atoms of intermediate A (Scheme 2) are almost equally acidic. Therefore, in the process of imidazolium ring closure, proton abstraction on the $C\alpha$ hydrogen appears to be an alternative pathway for the generation of the new electrophile, instead of the usual keto–enol rearrangement. Both the processes may



Scheme 2. Proposed reaction mechanism for the 2-carboxyl-substituted imidazolium ion formation, ion 4, in the glyoxal reaction system.

however coexist, and simple imidazolium ions and formation of 2-carboxyl-substituted imidazolium ion, ions **2** and **4**, respectively, can result from competitive reactions. Another possible explanation for the rapid decrease in abundance of ion **4** with time in the ESI mass spectra (results not shown) could be related to the rapid consumption of the OH^- in solution available for proton abstraction, since the reaction pH is neutral (*ca.* 7.5). Furthermore, if we consider the two factors mentioned above for ion **4**, i.e. the absence of electron donor substituents in the diol group to promote carboxylic acid release and the stabilized new electrophile generated, important for imidazolium ring closure, one might suggest that in the formation of 2-carboxyl-substituted imidazolium ion, no electron donor substituent is present in the diol group and the new electrophile generated is destabilized. This could possibly induce the development of another competitive reaction pathway that might more easily favour the generation of the new electrophile to promote imidazolium ring closure (Scheme 2).

Acetyl derivatives of CML and N_ϵ -(carboxyethyl)lysine (CEL) have not been detected in our study. This was somewhat surprising, since these two compounds seem to be quite relevant according to the literature.^{12–14,27} An explanation could be the fact that these compounds are acid labile, and can also be developed in acidic medium workup procedures, which may render the confirmation of their existence difficult.

We are convinced that to confer equal stability and symmetry to both MGO molecule electrophiles, which could be achieved, for example, by reaction of a simple substituted amine with the MGO molecule, would minimize imidazolium ion formation. Moreover, a minimization of imidazolium ion formation has been observed when diacetyl reacts with AcLys (Table 1). This latter dicarbonyl has been used for a number of years as a standard arginine modifier, and this modification is reasonably considered a readily reversible process.^{46–48} In addition, a modified MGO molecule, with more stability (and symmetry) in both developed electrophiles, as is the case of the diacetyl molecule, might result in less different products with less stability. This stabilization and symmetry of both dicarbonyl electrophiles seem, therefore, to have an important role, considering that imidazolium compounds and their derivatives are relatively stable in aqueous solution.

CONCLUSIONS

In the four reaction systems studied, several dicarbonyl-derived lysine dimer ions were identified and characterized. Besides the identification of the acetylated GOLD and MOLD ions, all other ions, especially the ones corresponding to the most relevant dicarbonyls, glyoxal and MGO, have not, to our knowledge, been reported before. Simple imidazolium ions, ions **2**, in particular, possess the higher relative abundances in the ESI mass spectra of all reaction systems, except for the MGO system. In terms of reaction mechanics, the imidazolium ions appear to have versatile structures upon closure of the imidazolium ring. The diimine intermediate

behaves as a nucleophile when reacting with aldehydic and ketonic carbonyl group of the dicarbonyl molecules. This observation is particularly important for asymmetrical dicarbonyls, and also contributes to the high equilibrium concentration of the respective mono-hydrated dicarbonyl molecules, as in the case of 2-alkyl-substituted imidazolium ions, ions **3**. Furthermore, and despite the important concentration in solution of mono-hydrated phenylglyoxal forms, its reactivity with the ketonic carbonyl group, such as in ions **3**, is not favoured, and may account for the higher electrophile stability of this latter group. Nevertheless, when the difference in the stability of both developed dicarbonyl electrophiles is not so prominent, which is the case for the MGO molecule, the attack towards the ketonic group is favoured. Carboxylic acid release was absent in 2-carboxyl-substituted imidazolium ion, ion **4** – glyoxal reaction system. In the formation of ions **4**, when compared with that of ions **2**, a competitive reaction pathway becomes important for imidazolium ring closure. Furthermore, aspects related with the type of electron donor substituent character (or absence) in the diol group formed and the stability of the new electrophile generated seem to have an important role in the formation of imidazolium ions. The instability observed for some of the ions identified, namely, the ions at *m/z* 455 and 497, for glyoxal and MGO reaction systems, respectively, should also be mentioned. These compounds, if able to survive *in vivo*, might be used as novel standards to monitor and/or approach new therapies in the disease processes they would be related with, especially in an early stage. Furthermore, alkyl- and carboxyl-substituted imidazolium ions and a substituted dihydro-1,4-diazepine were obtained in these reactions.

We believe our observations combining both solution and gas-phase experiments may contribute to a better understanding of the solution chemistry of imidazolium salts. They may also be used as possible alternative pathways for the syntheses of substituted imidazolium salts and substituted 1,4-diazepine compounds.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr Carlos Cordeiro and Prof. Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their inestimable contribution to this work, especially in the non-enzymatic glycation area. Discussions with Prof. Susana Santos are also acknowledged. One of the authors, M. Saraiva, thanks Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for a Ph.D. scholarship (SFRH/BD/3161/2000).

APPENDIX

Experimental details: preparation and incubation of the reaction mixtures

The solutions of the dicarbonyls were pre-incubated at 70 °C except for MGO and diacetyl dicarbonyl solutions, because at this temperature reversible acetal formation (the MGO precursor form) occurred together with some hydration of the dicarbonyl molecules. The glyoxal and phenylglyoxal solutions did not show significant alterations in their reactivity due to the pre-incubation procedure, and were, therefore, the only two dicarbonyl solutions submitted to this procedure (70 °C).

Phenylglyoxal solubility in water is limited; therefore it was necessary to place the solution in an ultrasonic water bath (Sonorex TK 52H) at 40 °C to ensure its complete solubility.

Methylglyoxal was the only reaction system for which pH of the resulting solution needed to be adjusted, already at the beginning of its incubation, using a pH meter, E516 *titraskop*, connected to a glass membrane electrode. In general, the pH of the reaction mixtures, starting at 7.5, gradually diminished with time. In order to keep an acceptable range of one pH unit difference, $7.5 \leq \text{pH} \leq 6.5$,⁴ all reaction solutions were adjusted in the first 4 h of incubation.

At –20 °C, sample colour and/or peak relative intensity in the ESI mass spectra changed significantly in a few hours. Since sample solidification did not produce relevant alterations, the temperature of –80 °C was therefore used.

REFERENCES

- Maillard L-C. Action des acides amines sur les sucres: formation des melanoidines par voie methodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser.* 1912; **154**: 66.
- Lacovella GM, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. The role of reactive α -dicarbonyls in AGE/ALE formation and implication in diabetic complications. *South Carolina Journal of Molecular Medicine* 2004; **5**: 73.
- Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; **48**: 1.
- Martins SIFS. Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. Ph.D. Thesis, Wageningen University: The Netherlands, 2003.
- Ahmed N, Thornalley PJ. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated *in vitro* by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *Biochem. J.* 2002; **364**: 15.
- Chellan P, Nagaraj RH. Protein crosslinking by the Maillard reaction: dicarbonyl-derived imidazolium crosslinks in aging and diabetes. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; **368**: 98.
- Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
- Singh R, Barden A, Mori T, Beilin L. Advanced glycation end-products: a review. *Diabetologia* 2001; **44**: 129.
- Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N_ϵ -carboxymethyl-lysine- and N_ϵ -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
- Mlakar A, Spiteller G. Reinvestigation of lipid peroxidation of linolenic acid. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; **1214**: 209, DOI: 10.1016/0005-2760(94)90046-9.
- Murata-Kamiya N, Kamiya H, Kaji H, Kasai H. Glyoxal, a major product of DNA oxidation, induces mutation at G:C sites on a shuttle vector plasmid replicated in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1997; **25**: 1897.
- Dunn JA, Patrick JS, Thorpe SR, Baynes JW. Oxidation of glycated proteins: age-dependent accumulation of N_ϵ -(carboxymethyl)lysine in lens proteins. *Biochem. J.* 1989; **28**: 9464.
- Dyer DG, Blackledge JA, Thorpe SR, Baynes JW. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of glucose and other carbohydrates as possible precursors of pentosidine *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 11654.
- Dyer DG, Dunn JA, Thorpe SR, Bailie KE, Lyons TJ, McCance DR, Baynes JW. Maillard reaction products and their relation to complication in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1993; **91**: 2463.
- Kevin J, Wells-Knecht KJ, Brinkmann-Frye E, Baynes JW. Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and N_α -hippuryllysine: a model for Maillard reaction crosslink in proteins. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
- Brinkmann-Frye E, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. Characterization of an imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and N^α -hippuryllysine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* 1995; **22**: 2817.
- Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 1999; **344**: 109.
- Iijima K, Murata M, Takahara H, Irie S, Fujimoto D. Identification of N^ω -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem. J.* 2000; **347**: 23.
- Glomb MA, Lang G. Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493, DOI: 10.1021/jf001082d.
- Hayasi T, Mase S, Namiki N. Formation of three-carbon sugar fragments at an early stage of the browning reaction of sugar with amine or amino acids. *Agric. Biol. Chem.* 1986; **50**: 1959, DOI: 10.1021/jf960067z.
- Portero-Otin M, Bellmunt MJ, Requena JR, Pamplona R. Protein modification by advanced Maillard adducts can be modulated by dietary polyunsaturated fatty acids. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; **31**: 1403.
- Ray M, Ray S. Aminoacetone oxidase from goat liver. Formation of methylglyoxal from aminoacetone. *J. Biol. Chem.* 1987; **262**: 5974.
- Reichard GA, Skutches CL, Hoeldtke RD, Owen OE. Acetone metabolism in humans during diabetic ketoacidosis. *Diabetes* 1986; **35**: 668.
- Abordo EA, Minhas HA, Thornalley PJ. Accumulation of α -oxoaldehydes during oxidative stress. A role in cytotoxicity. *Biochem. Pharmacol.* 1999; **58**: 641.
- Thornalley PJ. The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *Biochem. J.* 1990; **269**: 1.
- Philips SA, Thornalley PJ. The formation of methylglyoxal from triosephosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *Eur. J. Biochem.* 1993; **212**: 101.
- Ahmed MU, Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N_ϵ -(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 1997; **324**: 565.
- Murata-Kamiya M, Kamiya H. Methylglyoxal, and endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nuc. Acids Res.* 2001; **29**: 3433.
- Bowes JH, Cater CW. The interaction of aldehydes with collagen. *Biochem. Biophys. Acta* 1968; **168**: 341.
- Halder J, Ray M, Ray S. Inhibition of glycolysis and mitochondrial respiration of Ehrlich ascites cells by methylglyoxal. *Int. J. Cancer* 1993; **54**: 443.
- Al-Abed Y, Misuhashi T, Ulrich P, Bucala R. Novel modifications of N^α -BOC-arginine and N^α -CBZ-lysine by methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996; **6**: 1577.
- Lee K-G, Shibamoto T. Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Rev. Int.* 2002; **18**: 151.
- Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. (in preparation).
- Lapolla A, Fedele D, Plebani M, Aronica R, Garboglio M, Seraglia R, D'Alpaos M, Traldi P. Evaluation of glycated globins by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Clin. Chem.* 1999; **45**: 288.
- Lapolla A, Fedele D, Traldi P. The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes. *Mass Spectrom. Rev.* 2000; **19**: 279.

36. Yeboah FK, Yaylayan VA. Analysis of glycated proteins by mass spectrometry techniques: qualitative and quantitative aspects. *Nahrung* 2001; **45**: 164.
37. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 1999; **110**: 145.
38. Kellum MW, Oray B, Norton SJ. A convenient quantitative synthesis of methylglyoxal for glyoxalase I assays. *Anal. Biochem.* 1978; **85**: 586.
39. Good NE, Winglet GD, Winter W, Conolly TN, Izawa S, Singh RMM. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 1966; **5**: 467.
40. Good NE, Izawa S. Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol.* 1972; **24**: 53, DOI: 10.1016/0076-6879(72)24054-x.
41. Nagaraj RH, Shipanova IN, Faust FM. Protein cross-linking by the Maillard reaction. Isolation, characterization, and *in vivo* detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 19338.
42. Odani H, Shinzato T, Usami J, Matsumoto Y, Brinkmann-Freye E, Baynes JW, Maeda K. Imidazolium crosslinks derived from reaction of lysine with glyoxal and methylglyoxal are increased in serum proteins of uremic patients: evidence for increased oxidative stress in uremia. *FEBS Lett.* 1998; **427**: 381.
43. Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, Kornfield JA. Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* 2003; **369**: 705.
44. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **344**: 29.
45. Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 2000; **60**: 55, DOI: 10.1016/S0006-2952(00)002887-2.
46. Grossberg AL, Pressman D. Modification of arginine in the active sites of antibodies. *Biochemistry* 1968; **7**: 272.
47. Yankeelov JA Jr. Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. *Biochemistry* 1970; **9**: 2433.
48. Yankeelov JA Jr. Modification of arginines by diketones. *J. Methods Enzymol.* 1972; **15**: 566.

6.2. Conclusões.

Nas reacções da acetil-lisina com os α -dicarbonilos aldeídicos (glioal, metilglioal e fenilglioal) e dicetónico (diacetil), foram identificados e caracterizados, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa ESI, compostos de imidazólio simples, compostos de imidazólio substituídos na posição 2 do anel de imidazolo e um composto do tipo diazepina. Os compostos de imidazólio simples apresentam, no espectro de massa ESI, abundâncias relativas superiores, faces aos compostos de imidazólio substituídos e ao composto do tipo diazepina. Na literatura, as reacções do composto de lisina referido com os dicarbonilos glioal e metilglioal encontram-se francamente estudadas [4,5], apesar de, no presente estudo, terem sido adicionalmente identificadas outras formas de compostos de imidazólio para os sistemas dos dois dicarbonilos aldeídicos referidos. A variedade de compostos de imidazólio identificados para os quatro sistemas de reacções em causa, permitiu, conjuntamente com alguma informação reunida sobre a variação das abundâncias relativas dos iões imidazólio estruturalmente semelhantes, a elaboração de uma concepção mecanística coerente, para as reacções da acetil-lisina com α -dicarbonilos, assistida também por informação adequada disponível na literatura. Deste modo, em termos da mecanística de reacção proposta, verifica-se que a formação dos compostos de imidazólio implica a existência de alguma versatilidade quando da formação do anel de imidazólio. Assim, foi possível discriminar a importância de dois factores, responsáveis pela versatilidade na formação de estruturas imidazólio, para os sistemas de reacções em causa. Este factores compreendem-se pela presença (ou ausência) de substituintes dadores de electrões no grupo diol formado ao nível do intermediário diimina reagido, i.e. com uma molécula de dicarbonilo, e pelo carácter do novo electrófilo formado, também ao nível do intermediário diimina reagido. Assim, depreende-se a importância do intermediário diimina na formação dos compostos de imidazólio. Os factores mencionados fornecem uma explicação coerente para a formação dos compostos de imidazólio simples e para a formação dos compostos de imidazólio substituídos na posição 2 do anel de imidazolo. Quando os dois factores são ambos favoráveis, ou ambos desfavoráveis, tem-se a formação dos compostos de imidazólio simples e de imidazólio substituídos na posição 2. Isto sucede na medida em que se dois factores, importantes para a formação de um dado produto de reacção, são descompensados, numa dada reacção, não devendo em princípio existir grande alteração no mecanismo reaccional. No caso de apenas um dos dois factores ser favorável, poderá existir a possibilidade de desenvolvimento de um

processo de reacção alternativo para a formação de um produto de reacção. Em relação à reactividade do intermediário diimina, verifica-se que pode reagir quer com o grupo aldeído quer com o grupo cetónico das formas de α -dicarbonilo. Todavia, nesta situação, a reactividade prevista para o intermediário diimina, em relação ao tipo de carbonilo (aldeídico ou cetónico) reagido e sua estabilidade, revela-se concordante com as abundâncias iónicas observadas para os compostos de imidazólio em causa, no espectro de massa ESI.

A diversidade dos produtos de reacção, identificados por técnicas ESI-MS, na reacção da acetil-lisina com α -dicarbonilos aldeídicos e cetónico, e a coerente proposta mecanística estabelecida para estes sistemas de reacções, pode ser de extrema utilidade para a monitorização dos processos de glicação, em particular dos que se respeitam à reactividade dos resíduos de lisina. Como foram identificados compostos menos estáveis, que as formas de imidazólio simples e que algumas formas de imidazólio substituídas na posição 2 do anel de imidazolo, é possível utilizar esta informação, de forma a prever a extensão dos processos de glicação, se as formas menos estáveis referidas sobreviverem nas condições *in vitro* e *in vivo*.

Interessa referir que, para a reacção do dicarbonilo diacetil, se observou a formação mínima de um composto de imidazólio. Nos sistemas de reacções estudados, da acetil-lisina com os vários α -dicarbonilos, torna-se favorável o uso de abundâncias relativas dos iões imidazólio, observadas no espectro de massa ESI, e da sua comparação, pois os compostos são estruturalmente semelhantes, com razões massa/carga francamente próximas, na sua generalidade. O resultado anterior, associado ao facto das reacções da acetil-lisina com formas de α -dicarbonilo de maior cadeia carbonada, como 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona, não conduzirem à formação de compostos de imidazólio, de qualquer tipo, é indicativo de que os compostos de α -dicarbonilo dicetónicos não produzem grandes modificações nos resíduos de lisina, o que reforça a especificidade dos compostos de α -dicarbonilo aldeídicos, como glioxal, metilglioxal e fenilglioxal, na reactividade dos resíduos de lisina, sugerindo, por conseguinte, a importância das formas hidratadas dos α -dicarbonilos aldeídicos nas reacções em causa.

6.3. Bibliografia.

- [1] Enke CG. *Anal. Chem.* 1997; **69**: 4885.
- [2] Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 625.
- [3] Sunner J, Nicol G, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1300.
- [4] Kevin J, Wells-Knecht KJ, Brinkmann-Frye E, Baynes JW. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
- [5] Brinkmann-Frye E, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1995; (22): 2817.

7. Reacções da arginina com α -dicarbonilos.

7.1. Um estudo compreensivo sobre a reactividade de uma arginina modificada com compostos dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos por espectrometria de massa de electrospray.

7.1.1. Objectivos.

Nesta secção de capítulo, apresenta-se um estudo realizado sobre a reactividade do composto de arginina modificado, acetil-arginina, com compostos α -dicarbonilo aldeídicos (glioxal, metilglioxal e fenilglioxal) e dicetónico (diacetil), i.e. o mesmo conjunto de compostos α -dicarbonilo estudados, no trabalho descrito no capítulo anterior. Com o presente estudo pretende-se obter uma informação detalhada sobre a reactividade da arginina modificada com compostos α -dicarbonilo, tendo presente a noção de que os resíduos de arginina (e de lisina) constituem alvos relevantes para a ocorrência da reacção de Maillard. De uma forma mais concreta, com este estudo pretende-se: (i) identificar e caracterizar reagente e produtos de reacção, por recurso a técnicas de espectrometria de massa ESI, (ii) comparar a informação obtida, do ponto de vista dos aspectos de estrutura dos produtos de reacção identificados em ESI-MS, com a informação existente na literatura, (iii) utilizar alguma informação espectral, em particular das abundâncias relativas dos iões de interesse detectados no espectro de massa ESI, de forma a reunir informação para o comportamento cinético das reacções envolvidas, (iv) relacionar os perfis de fragmentação dos iões de interesse, obtidos na análise do espectro de massa MS-MS, com os perfis das reacções dos correspondentes compostos; constatou-se a existência de uma franca semelhança entre as possíveis reacções ocorridas em solução com as reacções determinadas para certos iões de interesse na fase gasosa, quando da sua fragmentação, (v) propor um mecanismo para as reacções do composto acetil-arginina, tendo também em conta os aspectos da funcionalidade das formas de dicarbonilo em estudo, nas reacções em causa, e os resultados da literatura, no que respeita às propostas mecanísticas existentes; deve referir-se o facto da reacção da acetil-arginina com os dicarbonilos glioxal e metilglioxal se encontrar francamente abordada na literatura, (vi) contribuir para uma

melhor compreensão dos processos de glicação, sobretudo os que envolvem a modificação dos resíduos de arginina, nas proteínas, com base na informação reunida, e na natureza dos produtos de reacção determinados e correspondentes propostas mecanísticas.

Non-enzymatic model glycation reactions – a comprehensive study of the reactivity of a modified arginine with aldehydic and diketonic dicarbonyl compounds by electrospray mass spectrometry

Marco A. Saraiva,^{1,2} Carlos M. Borges^{1,2} and M. Helena Florêncio^{1,2*}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

² Center for Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

Received 20 December 2005; Accepted 6 March 2006

Non-enzymatic glycation (Maillard reaction) of long-lived proteins is a major contributor to the pathology of diabetes, and possibly aging and Alzheimer's disease. Among the amino residues in proteins arginine plays an important role, and its modification by sugar moieties generates the so-called *advanced glycation end products* (AGEs). Moreover, α -dicarbonyl compounds have been found as the main participants in those modifications.

Four α -dicarbonyl compounds, aldehydic and ketonic, were reacted with the modified amino acid N_α -acetyl-L-arginine (AcArg), in an attempt to establish structure/activity relationships for the reactivity of α -dicarbonyls with the amine compound. Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), combined with tandem mass spectrometry (MS/MS), was used to identify and characterize reagents, intermediates and reaction products. The fragmentation patterns of precursor ions showed similarities in all reaction systems studied, in which fragmentation of the amino acid residue prevails, especially for the dehydrated and/or multiple dehydrated precursor ions. For the non-hydrated ion species, fragmentation of the arginyl guanidino group was mainly observed. Specific information regarding the nature of the ions formed, in which the dicarbonyl electrophile character played an important role, was obtained. As an example, singly and doubly hydrated acetyl-argpyrimidine ions were detected for the methylglyoxal reaction only. For symmetrical dicarbonyls, glyoxal and diacetyl, the importance of steric contributions with respect to the energetic ones is discussed. Furthermore, the dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine ions for methylglyoxal and phenylglyoxal reactions revealed fragment ion compositions including the protonated molecules of acetyl-argpyrimidine, -hydroimidazolone and -5-methylimidazolone. An explanation for the acetyl-argpyrimidine formation from the acetyl-hydroimidazolone formation reaction is proposed. Aspects such as the amount of acetyl-hydroimidazolone formed, the response of the hydration equilibria of the dicarbonyl forms to the new unhydrated dicarbonyls introduced by the reversal of the acetyl-hydroimidazolone formation reaction and the stability of the dicarbonyl intermediate involved in the acetyl-argpyrimidine formation are proposed, as being responsible to control the formation of acetyl-argpyrimidine. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: non-enzymatic model glycation reactions; electrospray mass spectrometry; α -dicarbonyls; acetyl-arginine; advanced glycation end products

INTRODUCTION

The Maillard¹ reaction was developed at the beginning of the 20th century. Nevertheless, more extensive investigation on this reaction did not start before 1960. The lack of capable analytical instruments was certainly responsible for this.

The development of analytical techniques such as gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), as well as mass spectrometry (MS), enabled the analyses of the compounds involved in this reaction. The number of important reports published in this field gave the Maillard reaction a key role, in the last decade, especially due to its relationship with some chronic clinical complications associated with diabetes mellitus – retinopathy, neuropathy and nephropathy,² cataract,³ macrovascular disease,⁴ amyloidosis associated with Alzheimer's disease and chronic renal

*Correspondence to: M. Helena Florêncio, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal.
E-mail: mhflorencio@fc.ul.pt

dialysis.^{5,6} In food chemistry also, this reaction has a recognized importance. Among the many reactions occurring in processed foods, the non-enzymatic browning reaction, or the Maillard reaction, plays a very important role in the formation of several chemical species, including some toxic ones.⁷ This reaction involves a complex series of parallel and sequential reactions, by means of the non-enzymatic reaction of glucose, α -oxoaldehydes and other saccharides with proteins. Many different adducts, some of them fluorescent and coloured, are formed in the course of this reaction. In a simplified way, the Maillard reaction, or non-enzymatic glycation, is initiated with the reversible formation of a Schiff base between a reducing sugar and the amino group of a protein. The Schiff base, an unstable form, gives rise by spontaneous rearrangements to the keto-amine compound, a stable one, known as Amadori product – the Amadori rearrangement (Heyns rearrangement from ketoses). In the intermediate stage, the stable Amadori product undergoes, in a period of several months, a series of reactions to form small molecules with carbonyl groups, which are more reactive when compared with the initial sugar molecules. In the final stage, chemically irreversible, as the last one, molecular adducts named *cross-link products* (advanced glycation end products (AGEs)) are formed. In recent years, it was demonstrated that AGEs are formed not only from glucose but also from dicarbonyl compounds and short chain sugars, such as glycolaldehyde.⁸ The AGEs can be distinguished even with respect to its biological and physiological functions.⁹ AGEs can affect the interaction of proteins with cells, e.g. by altering the charge profile of the protein molecules and, even more importantly, by modifying the physicochemical properties of the protein by formation of intermolecular cross-links. In the past few years, more than a dozen AGEs have been discovered, of which good examples are the compounds pentosidine,¹⁰ pyrrole,¹¹ argpyrimidine,¹² tetrahydropyrimidine,¹³ carboxymethyl-lysine (CML),¹⁴ carboxyethyl-lysine (CEL),¹⁵ a number of imidazolones^{16–20} and methylglyoxal- and glyoxal-derived lysine–lysine cross-links (imidazolysine), MOLD and GOLD,^{21,22} respectively. Dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal, glyoxal, glucosones, deoxyglucosones and dehydroascorbate, are among identified intermediates in the

Maillard reaction.²³ With respect to the mentioned dicarbonyl compounds methylglyoxal and glyoxal, the former can be formed by the degradation of glycolytic intermediates, by lipid peroxidation systems, in the catabolism of amino acids or by oxidation of body acetone.²⁴ It is a highly reactive α -oxoaldehyde that interacts rapidly with amino, guanidino and thiol functional groups in proteins²⁵ and also with nucleic acids.²⁶ Glyoxal has been identified in sugar autooxidation,²⁷ lipid peroxidation²⁸ and during myeloperoxidase-mediated degradation of serine, at sites of inflammation.²⁹ This dicarbonyl also reacts fast with the amino groups of the proteins, despite the lesser diversity of AGEs identified in comparison with methylglyoxal dicarbonyl. Moreover, because of the high reactivity of glyoxal, the fraction of glyoxal bound to proteins may significantly exceed the measured glyoxal concentrations in plasma.^{30,31}

As an attempt to simplify the reaction process and to access AGEs, simple models have been considered, such as the reactions of simple amine compounds (and derivatives), amino acids and peptides with the dicarbonyl compounds methylglyoxal, glyoxal and deoxyglucosones. In a recent report,³² we identified a new set of carbonyl-derived lysine–lysine dimers, resulting from the reaction of acetyl-lysine with α -dicarbonyls, aldehydic and diketonic. For these dimers mechanistic information was provided, and a relationship between the hydration equilibria of the dicarbonyl forms and the dimer formation reactions was established. In the present study, the reactivity of the α -dicarbonyl molecules, aldehydic (glyoxal, methylglyoxal and phenylglyoxal) and diketonic (diacetyl) is investigated, and their different forms in solution, hydrated and non-hydrated, together with the amino compound *N* $_{\alpha}$ -acetyl-L-arginine (AcArg) (Fig. 1) studied. The dicarbonyl phenylglyoxal is known as a specific reagent for the arginine groups³³ used in the preparation of pyrrolinones and furan derivatives. It is also useful as a chemiluminescent reagent for purine determination. Moreover, the dicarbonyl diacetyl, a diketonic one, is used in the cyclocondensation with amines in the formation of triazine and pteridine ring systems and as a precursor to the α -diones. This dicarbonyl has been used for a number of years as a standard arginine modifier, and this modification is considered to be a readily reversible process. It has also been reported that lysine residues can

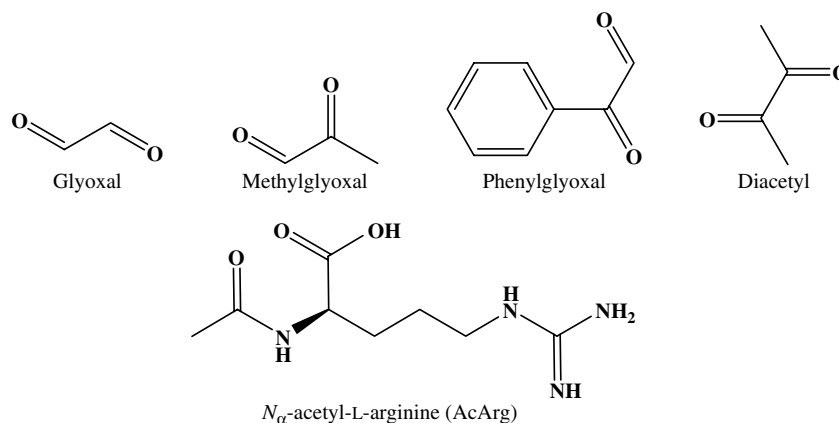


Figure 1. Chemical structures of α -dicarbonyls and acetyl-arginine (AcArg) compounds.

be modified by diacetyl^{34–36} and that diacetyl inactivates several enzymes.^{37,38} In a biological field-study, Maede *et al.* have reported that structurally related α -dicarbonyls such as glyoxal, methylglyoxal and diacetyl cross-link proteins at different rates.³⁹ The present study aims to establish a relationship between the structure of the dicarbonyl compound and its ability to react with the amino compound AcArg. This aspect has not yet been systematically explored from a chemical point of view. We decided to use electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) for a detailed investigation on the non-enzymatic reactions of the four mentioned dicarbonyl compounds with the amino compound AcArg. Moreover, the importance of mass spectrometry for non-enzymatic glycation studies is well recognized, ESI-MS and MALDI-MS being the most used analytical techniques for this purpose. Lapolla *et al.* have applied these techniques to study non-enzymatic glycation *in vitro* and *in vivo* conditions at the protein level.^{40–42} To identify and characterize *in vivo* intermediates and reaction products developed in non-enzymatic glycation reactions, these techniques have also been widely used, especially ESI-MS, combined with chromatographic methods.^{43–45} Furthermore, to better understand the chemical structures of the unknown compounds identified in the reactions under investigation, we have combined ESI with tandem mass spectrometry, MS/MS, experiments.

EXPERIMENTAL

Materials

The modified amino acid AcArg, the dicarbonyl compounds glyoxal, phenylglyoxal and diacetyl, and the sulfonic buffer 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium salt (HEPES sodium salt), were purchased from Sigma. The precursor for the dicarbonyl methylglyoxal, methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal, was purchased from Fluka. Ultrapure water (18,4 M Ω cm), twice distilled and deionised, was used in the preparation of the reaction mixtures and was produced in a Wasserlab G. R. apparatus. To adjust and to monitor the pH of the reaction solutions, and for the preparation of the sulfonic buffer, we used a saturated solution of sodium hydroxide, NaOH (solid pellets from Merck) and/or a concentrated solution of hydrochloric acid, HCl (Riedel-de Haën). All chemicals used were of the highest quality available.

Methylglyoxal synthesis from methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal acid hydrolysis

Commercially available methylglyoxal is mainly contaminated with formaldehyde (~30% in the solution) and also with other impurities such as pyruvate, lactate and formate.^{46,47} For this reason it is necessary to purify the manufactured methylglyoxal or to use, as in this work, other methods for methylglyoxal synthesis. In the present work methylglyoxal was prepared from methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal by acid hydrolysis, according to Kellum *et al.*⁴⁸ Experimentally, a mixture containing 2500 μ l of sulphuric acid, H₂SO₄, 1/10 (v/v) in ultrapure water, 2300 μ l of ultrapure water and 200 μ l of methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal was heated in a water bath and maintained in boiling-water temperature for 25 min (methylglyoxal yield

was *ca* 50%,³² by distillation). The resulting mixture was cooled and kept in ice until use.

Preparation and incubation of the reaction mixtures

One millilitre of the previously prepared buffer solution (200 mM) at pH 7.5 was added to 1 ml of the aqueous solution of the modified amino acid AcArg (100 mM). To this mixture was also added, separately, 1 ml of the aqueous solution of the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl (100 mM), up to a total volume of 3 ml, and the resulting mixture was immediately incubated in an oven (Mettmert, model 1500) at 70 °C under air circulation for 28 days. Only in the glyoxal and phenylglyoxal reaction systems the starting solutions were maintained at a temperature of 70 °C, even before incubation, to avoid any high temperature gradient. The starting solutions for methylglyoxal and diacetyl reaction systems were mixed at room temperature (r.t.) and immediately placed at 70 °C. Time-count was not initiated before the first 30 min of reaction. This was necessary for methylglyoxal and diacetyl dicarbonyl solutions because of the high incubation temperature employed, where the equilibrium concentration for the methylglyoxal precursor form used for methylglyoxal synthesis prevails, as well as because of the occurrence of some modification in diacetyl dicarbonyl molecules. The temperature of 70 °C was selected because the experiments performed at 30 °C showed that many products were detected over a period of several weeks. The selected temperature of 70 °C also ensures sterile reaction conditions, which, in some instances, were not met at 30 °C. Furthermore, aliquots of 150 μ l were taken at fixed time periods and immediately kept at –80 °C.

It is important to note that dicarbonyl phenylglyoxal, an aromatic compound, has limited solubility in water. It was necessary to place the solution in an ultrasonic bath (Sonorex TK 52H) for 15 min, approximately, at a temperature of 40 °C in order to ensure its complete solubility.

In the total of the four reactions studied, only the reaction mixture that contained the dicarbonyl methylglyoxal needed pH adjustment at the beginning of the incubation. This can be explained mainly by the high acidic character of the hydrolysed solution used in the preparation of this reaction mixture. Nonetheless, for all the reaction systems studied the pH of the media was adjusted in the first 4 h of incubation. Moreover, sample solidification at –80 °C did not produce any alteration, whereas at –20 °C, in some cases, the sample colour changed in a few hours time.

Methods

pH measurements in the reaction mixtures

The reactions studied took place after the addition of the dicarbonyl compound, which was the last component added. In selected time periods, the pH of the respective reaction solutions was measured using a pH meter, E516 *titriscop*, connected to a glass membrane electrode. The pH of the reaction mixtures was adjusted, especially of the one that included the dicarbonyl methylglyoxal. In general, the pH of the reaction mixtures diminished with the time of the

reactions, but on the order of 1pH unit, in the acceptable range of $7.5 \leq \text{pH} \leq 6.5$.⁴⁹

Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) measurements
The mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Duo ion-trap mass spectrometer equipped with an ESI source. The source was maintained at a voltage of 4.5 kV and the coaxial sheath and auxiliary gas (both nitrogen) flow-rates were of ca 20 psi. Furthermore, the capillary was kept at a voltage of ca 10 V and maintained at 220 °C. The pressure, measured with the convection gauge during electrospray experiments, was normally 0.92 torr. The base pressure in the ion-trap, filled with helium, was ca 1.12×10^{-5} torr. The mass spectra recorded were obtained by diluting the stored samples 200 times in ultrapure water. Samples were introduced directly in the ESI source at a flow-rate of 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Positive ion mode was selected for the experiments, and the mass range was m/z 50–1000. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 50 ms (default values), and the recorded mass spectra were based on 1-min acquisitions.

In the MS/MS experiments, the selected precursor ions were isolated in the ion-trap and forced to collide with helium gas. Therefore, for ionic species excitation a collision energy of 20–50% of the maximum available collision energy was applied. This magnitude of energy was chosen in order to ensure that the precursor ions could be observed in the ESI-MS/MS spectra, i.e. with a remaining peak intensity of about 1–5% for precursor ions. The total ion current was above 5×10^3 in all cases.

Mass spectrometric data were obtained by using the supporting software Xcalibur version.

Reaction systems and ESI-MS analysis were performed in duplicate. ESI-MS/MS spectra were repeated 2–3 times.

RESULTS AND DISCUSSION

Behaviour of the dicarbonyl reaction systems under ESI mass spectrometry

The amine compound AcArg was reacted with the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl at pH 7.5 and 70 °C. The ESI mass spectra (not shown) of solution aliquots of the reactions exhibited no or very little fragmentation. As an example, the ESI mass spectra of aliquots of methylglyoxal reaction system solutions are presented in Fig. 2. The relative abundances, normalized to the m/z 261 HEPES buffer ion, for the ions of interest are presented in Table 1. These ions of interest were attributed to the protonated molecules $[M + H]^+$. In the four reaction systems studied, protonated molecules of acetyl-dihydroxyimidazolidines, corresponding to ions at m/z 275, 289, 351 and 303 (ions 2) for glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl reaction systems, respectively, and of acetyl-hydroimidazolones, corresponding to ions at m/z 257, 271, 333 and 285 (ions 3) for glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl reaction systems, respectively, were observed. Moreover, for the diacetyl reaction alone the protonated molecule of hydroimidazolone $-\text{H}_2\text{O}$, m/z 267 ion (ion 4), was observed. Doubly and singly

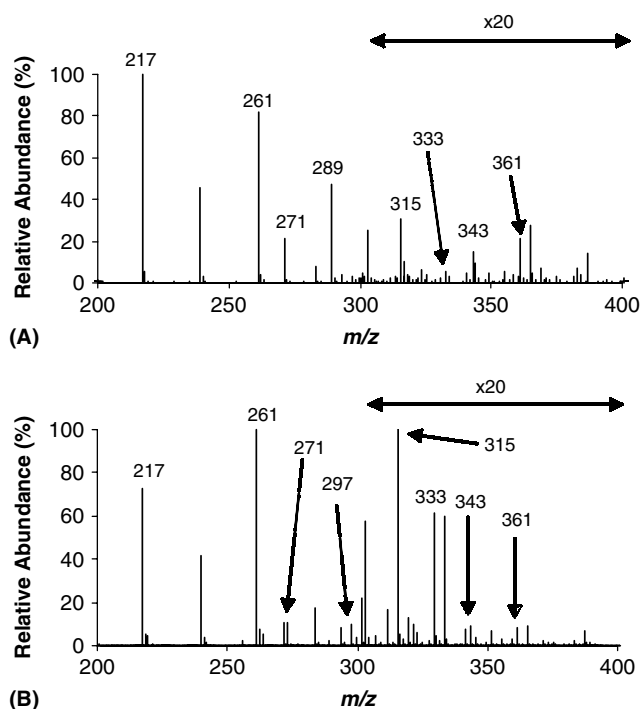


Figure 2. ESI mass spectra of aliquots of methylglyoxal reaction system solutions: (A) 60 min and (B) 1 day.

hydrated acetyl-argpyrimidine ions at m/z 333 (ion 5) and 315 (ion 6) were observed for the methylglyoxal reaction system, exclusively, together with the protonated molecules of acetyl-argpyrimidine, i.e. ions at m/z 297 and 421 (ions 7), for the methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems, respectively. For the latter reaction systems, the protonated molecules of acetyl-tetrahydropyrimidine (THP), ions at m/z 361 (methylglyoxal) and 485 (phenylglyoxal) (ions 8), and the protonated molecules of singly dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine, ions at m/z 343 (methylglyoxal) and 467 (phenylglyoxal) (ions 9), were also observed. For the diacetyl reaction system, the protonated molecules of acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine), ion at m/z 389 (ion 10), and its singly and doubly dehydrated forms, ions at m/z 371 (ion 11) and 353 (ion 12), respectively, were also detected.

More diversity of ions was observed for the asymmetrical dicarbonyl and for the diacetyl reaction systems, according to the ESI mass spectra of all four reaction systems (not shown). Since dicarbonyls react with AcArg at different rates, the ESI mass spectra were recorded at two different reaction times. Incubations with the amine compound and the four different dicarbonyls in HEPES buffer, at the same temperature and pH, were also conducted individually. It was observed that the dicarbonyl compounds did not react with HEPES, unless they were within the reaction mixture of the three components, amine/dicarbonyl/buffer. The corresponding peak intensities in the ESI mass spectra of these reaction mixtures were, however, very low, especially for the dicarbonyls glyoxal and methylglyoxal. The relative abundance of the buffer ion at m/z 261 in the ESI mass spectra did not change significantly with reaction time in the four dicarbonyl reaction systems studied. Therefore, this ion was used as an internal standard. Moreover, according to

Table 1. Identified compounds based on ESI-MS analysis and their normalized relative ion abundances at two different reaction times

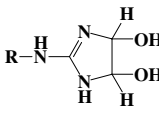
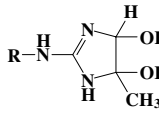
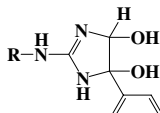
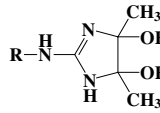
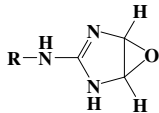
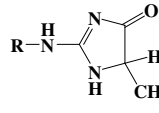
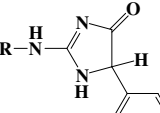
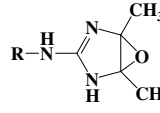
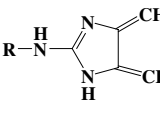
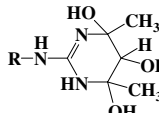
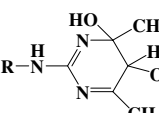
Ions of interest	Reactions systems (acetyl-arginine (AcArg) with glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl) m/z [M + H] ⁺ (Rel. abundance (%))			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Diacetyl
AcArg (1)	217 (15.4; ^a 52.4 ^{bc})	217 (121.9; ^a 72.5 ^b)	217 (91.0; ^a 114.2 ^b)	217 (98.1; ^a 166.5 ^{bc})
Dihydroxyimidazolidine (2)	275 (118.6; 58.4)	289 (57.2; 2.1)	351 (4.3; 1.9)	303 (41.3; 0.7)
Hydroimidazolone (3)	257 (14.7; 11.8)	271 (25.8; 10.8)	333 (193.2; 1.3)	285 (9.0; 2.3)
Hydroimidazolone –H ₂ O (4)	C	C	C	267 (8.3; 11.5)
Argpyrimidine +2H ₂ O (5)	C	333 (D; 3.0)	C	C
Argpyrimidine +H ₂ O (6)	C	315 (1.9; 5.4)	C	C
Argpyrimidine (7)	C	297 (D; 10.0)	421 (8.2; 21.0)	C
Tetrahydropyrimidine (8)	C	361 (1.3; D)	485 (1.1; D)	C
Tetrahydropyrimidine – H ₂ O (9)	C	343 (0.9; 0.5)	467 (8.8; 0.6)	C
Bis(dihydroxyimidazolidine) (A) (10)	C	C	C	389 (50.0; 0.6)
(A) –H ₂ O (11)	C	C	C	371 (56.7; 218.6)
(A) –2H ₂ O (12)	C	C	C	353 (8.7; 15.6)

^a 60 min reaction time.^b 1 day reaction time.

C – Not detected ions.

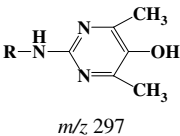
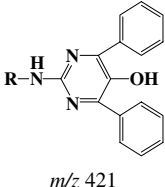
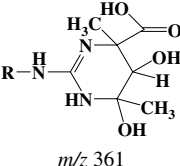
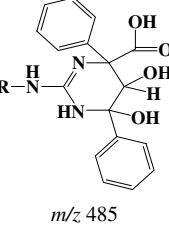
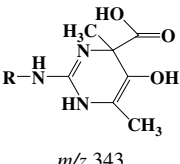
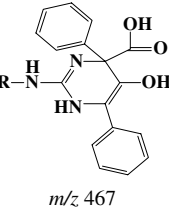
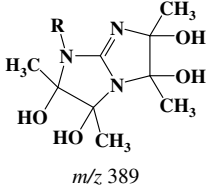
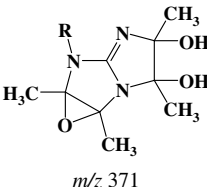
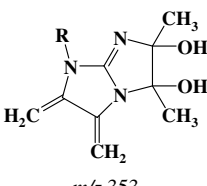
D – Relative ion abundances < 0.5%.

^c Higher relative abundances for AcArg ion, accounting for reaction products formed under reversible reaction conditions. The relative abundances are normalized to the m/z 261 ion of the buffer compounds.**Table 2.** Proposed ion structures for the compounds of interest in the ESI mass spectra (Table 1)

Compounds of interest	Reaction systems (acetyl-arginine (AcArg) with glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl) and possible ion structures ^a			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Diacetyl
2	 m/z 275	 m/z 289	 m/z 351	 m/z 303
3	 m/z 275	 m/z 289	 m/z 351	 m/z 303
4	–	–	–	 m/z 267
5	–	 m/z 333	–	–
6	–	 m/z 315	–	–

(continued overleaf)

Table 2. (Continued)

Compounds of interest	Reaction systems (acetyl-arginine (AcArg) with glyoxal, methylglyoxal, phenylglyoxal and diacetyl) and possible ion structures ^a			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Phenylglyoxal	Diacetyl
7	–	 m/z 297	 m/z 421	–
8	–	 m/z 361	 m/z 485	–
9	–	 m/z 343	 m/z 467	–
10	–	–	–	 m/z 389
11	–	–	–	 m/z 371
12	–	–	–	 m/z 353

^a All ion structures proposed refer to singly protonated molecules, $[M + H]^+$.

R = $\text{CH}(\text{COOH})(\text{NHCOCH}_3)(\text{CH}_2)_3$.

– Not detected.

ESI analysis, the buffer ions do not appear to cause a relevant suppression effect.³²

Identification and characterization of reaction products

On the basis of ESI-MS/MS analysis (not shown) ion structures for the ions of interest, 2–12 (Table 1), are proposed in Table 2. These assignments are sustained, as described below, by the fragmentation patterns depicted in Tables 3 and 4 for symmetrical and asymmetrical dicarbonyl

reactions systems, respectively. In order to make the discussion on ion structure assignments clearer, the ions of interest (Table 1) are grouped into four main classes. These ion classes encompass: ions 2, 3 and 4; ions 5, 6 and 7; ions 8 and 9; and ions 10, 11 and 12.

The ions at m/z 275, 289, 303 and 351 (Table 1 – ions 2), identified in the ESI spectra (not shown) of the four reaction systems, revealed similar fragmentation patterns, with two consecutive losses of water, as well as the loss of one dicarbonyl molecule from the $[M + H]^+$ precursor ions, as shown

Table 3. Relative abundances (%) of fragment ions, derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 1), for glyoxal and diacetyl reaction systems

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (precursor ion: glyoxal; diacetyl)						
	217 ^a (ion 1)	275; 303 (ions 2)	257; 285 (ions 3)	–; 267 (ions 4)	–; 389 (ions 10)	–; 371 (ions 11)	–; 353 (ions 12)
[M + H – NH ₃] ⁺	100	–	–	–	–	–	–
[M + H – CH ₅ N ₃] ⁺	14.4	–	–	–	–	–	–
[M + H – H ₂ O] ⁺	22.4	100; 66.6	100; 100	–; 100	–; 100	–; 100	–; 100
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	^b	6.4; 6.1	–	^b	–; 35.0	–; 16.2	^b
[(M + H – H ₂ O) – 2* H ₂ O] ⁺	^b	–	^b	^b	–; 1.4	–	^b
[((M + H – H ₂ O) – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	^b	–	^b	^b	–	–; 1.5	^b
[M + H – 2* H ₂ O] ⁺	^b	–	–	^b	–	–	–; 0.5
[M + H – HCOOH] ⁺	–	–	3.2; –	–	–	–	–
[M + H – CH ₂ CO] ⁺	8.6	–	25.5; 3.4	–; 2.4	–	–	–; 78.6
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ CO] ⁺	50.3	–	5.4; –	–; 6.8	–	–	–; 41.1
[M + H – 105] ⁺	1.1	–	42.1; 4.0	–; 4.9	–	–	–; 7.8
[M + H – 105 – C ₃ H ₆] ⁺	1.4	–	–	–	–	–	–
[M + H – 155] ⁺	–	–	–	–; 11.3	–	–	–; 5.9
[M + H – 157] ⁺	–	–	1.8; –	–	–	–	–
[(M + H – H ₂ O) – 155] ⁺	^b	–	–; 1.8	^b	–	–	^b
[M + H – dicarb] ⁺	^b	6.7; 100	^b	^b	–	–; 0.5	–; 6.0
[(M + H – H ₂ O) – dicarb] ⁺	^b	^b	^b	^b	–	–; 18.5	^b
[((M + H – H ₂ O) – H ₂ O) – dicarb] ⁺	^b	^b	^b	^b	–; 3.1	^b	^b
[(M + H – dicarb) – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	^b	^b	^b	^b	–	–; 6.4	^b
[M + H – 2* dicarb] ⁺	^b	^b	^b	^b	–; 82.3	^b	^b

[–] Not detected.^a Protonated acetyl-arginine (AcArg) molecule.^b Not applicable. The losses of 105, 155 and 157 Da refer to C₃H₇O₃N (CH₂CO + NH₃ + CO + H₂O), C₇H₉O₃N and C₇H₁₁O₃N ion residues, respectively. Dicarb stands for dicarbonyl.**Table 4.** Relative abundances (%) of fragment ions, derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 1), for methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (precursor ion: methylglyoxal; phenylglyoxal)						
	289; 351 (ions 2)	271; 333 (ions 3)	333; – (ions 5)	315; – (ions 6)	297; 421 (ions 7)	361; 485 (ions 8)	343; 467 (ions 9)
[M + H – H ₂ O] ⁺	100; 100	100; 51.3	100; –	100; –	100; 100	100; 100	100; 2.8
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	0.9; 1.3	^a	–	–	^a	–	^a
[M + H – C ₂ H ₄ O] ⁺	–	–	–	6.4; –	–	–	–
[M + H – CO ₂] ⁺	–	–	–	–	–	–	1.7; 0.6
[(M + H – H ₂ O) – CO ₂] ⁺	–	^a	–	–	^a	–	–; 1.3
[M + H – HCOOH] ⁺	–	5.0; 2.2	–	–	–	–	6.0; 1.5
[M + H – CH ₂ CO] ⁺	–	27.8; 17.3	–	–	0.6; 1.9	–	3.7; –
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ CO] ⁺	–	12.9; 3.3	–	–	7.9; 12.9	–	2.2; –
[M + H – 105] ⁺	–	33.8; 32.1	–	–	5.1; 8.2	–	–
[M + H – 157] ⁺	–	–; 12.1	–	–	–	–	–
[M + H – dicarb] ⁺	1.3; 10.3	^a	^a	^a	^a	^a	–
[(M + H – C _b H _c O ₂)] ⁺	–	^a	–	–	^a	–	9.8; 13.1
[(M + H – C _b H _{c+2} O ₂)] ⁺	–	^a	–	–	^a	–	32.3; 100
[M + H – dicarb – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	^a	^a	^a	^a	^a	^a	0.9; –

[–] Not detected.^a Not applicable. Methylglyoxal reaction system: *b* = 3 and *c* = 4; Phenylglyoxal reaction system: *b* = 8 and *c* = 6. The losses of 105 and 157 Da refer to C₃H₇O₃N (CH₂CO + NH₃ + CO + H₂O) and C₇H₁₁O₃N ion residues, respectively. Dicarb stands for dicarbonyl.

in Tables 3 and 4, m/z 275; 303 and m/z 289; 351, respectively. The dicarbonyl loss argues for the complete release of the dicarbonyl molecule, with the formation of the protonated molecule of AcArg (Fig. 1). These losses of water and dicarbonyl molecules were attributed to an imidazolidine ring formation (Table 2 – ions 2). This assignment is further reinforced, since characteristic losses from the amino acid residue, i.e. acetyl and acetyl + NH₃ + CO + H₂O, were absent (see e.g. m/z 217 ion in Table 3). Furthermore, in the fragmentation pattern of the acetyl-dihydroxyimidazolidine protonated molecules (ions 2) the release of two water molecules should be expected, accounting for the presence of the 1,2-diol in the imidazolidine ring. Nonetheless, this loss of two water molecules was found to be more pronounced in the symmetrical dicarbonyl reaction systems (m/z 275 and 303 ions, in Table 3). These observations can account for some stability provided by the stereochemical aspects of the dicarbonyl molecules involved. Studies^{18,30,50} in the literature confirm the existence of the dihydroxyimidazolidine compound in solution. Moreover, the reported slow conversion of the dihydroxyimidazolidine¹⁸ in the methylglyoxal reaction, and the high amount of the same compound⁵⁰ in the glyoxal reaction, are in good agreement with the relative ion abundances we observed (Table 1) for the acetyl-dihydroxyimidazolidine protonated molecules. Furthermore, alternative ion structures for ions 2, the *N*_ω-carboxymethylarginine (CMA)⁵¹ and *N*_ω-carboxyethylarginine (CEA)⁵² ions, corresponding to the acetylated CMA (glyoxal reaction) and CEA (methylglyoxal reaction) ions (Fig. 3 – (I) and (II)), are excluded, since the expected loss of the carboxymethyl/carboxyethyl-arginyl guanidino group and the subsequent release of HCOOH⁵³ were not observed in the fragmentation pattern of ions 2. Moreover, CMA and CEA have been considered as probable degradation products of hydroimidazolone, and therefore formed irreversibly.⁵⁴ Therefore, these products may appear, but at a later reaction time course.

The ions at m/z 257, 271, 285 and 333 (Table 1 – ions 3) fragmented to give more fragment ions when compared with ions 2, and the fragmentation observed was mostly from the amino acid residue (Tables 3 and 4). For ions 3, the most prominent losses were H₂O, acetyl (42 Da) and acetyl + NH₃ + CO + H₂O (105 Da), the former from the arginyl guanidino moiety formed and the two latter ones from the amino acid residue. For comparative purposes, the ESI mass spectrum of AcArg was run, which revealed a fragmentation pattern with the losses of acetyl and acetyl + NH₃ + CO + H₂O (Table 3 – m/z 217 ion). This confirms, therefore, that the losses we observed for ions 2 are from the amino acid residue. Losses of H₂O, acetyl and acetyl + NH₃ + CO + H₂O were also observed in the MS/MS spectra of protonated triisidines.⁸ These losses result from acetyl-lysine residues present in the ion structures, although the loss of H₂O seems to be more important for acetyl-lysine residues than for acetyl-arginine. Moreover, the release of a complete amino acid residue, C₇H₁₁O₃N₂ (157 Da), can be responsible for the existence of a stable ion moiety at the arginyl guanidino group. Such an amino acid release (157 Da) was observed for glyoxal and phenylglyoxal reaction systems, as shown in Tables 3 and 4 for m/z 257 and 333

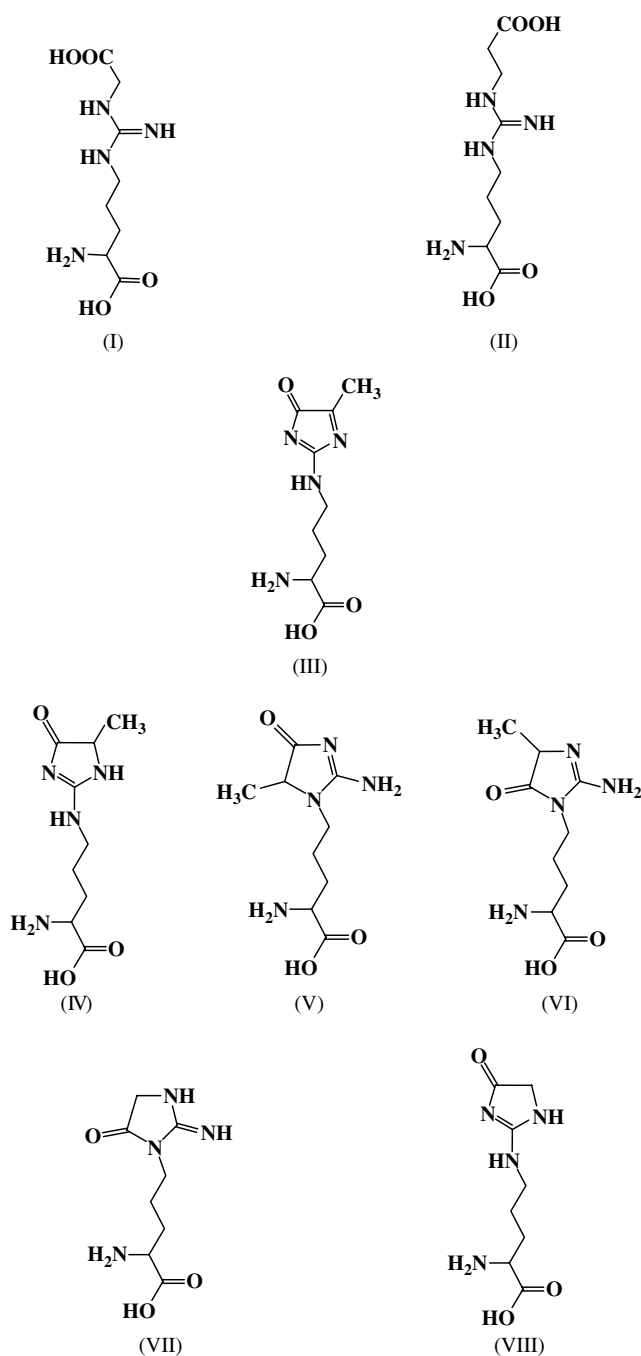


Figure 3. Chemical structures of *N*_ω-carboxymethylarginine (CMA) (I), *N*_ω-carboxyethylarginine (CEA) (II), 5-methylimidazolone (III), hydroimidazolone MG-H1 (isomer 1) (IV), hydroimidazolone MG-H2 (isomer 2) (V), hydroimidazolone MG-H3 (isomer 3) (VI), hydroimidazolone Glarg (VII) and hydroimidazolone αNFC-1 (VIII).

ions, respectively. In other glyoxal and methylglyoxal reaction studies, non-acetylated hydroimidazolone AGE ions for glyoxal and methylglyoxal reaction systems revealed the neutral loss of C₅H₉O₂N (115 Da; 115 Da + acetyl = 157 Da), from the amino acid residue.^{43–45,55} This loss of 115 Da was, in some of those studies, used to perform tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring (MS MRM) experiments.^{43–45} This information reinforces the results obtained in our work, which show that the fragmentation at

the amino acid residue of acetyl-hydroimidazolone ions is important for their identification. Ions **3** seem, therefore, to possess the structure of acetyl-hydroimidazolone protonated molecules, in which the stable moiety refers to the imidazolone ring (Table 2 – ions **3**). Acetyl-hydroimidazolone and acetyl-dihydroxyimidazolidine compounds are, in fact, the reaction products in solution.¹⁸ Moreover, for glyoxal and diacetyl reactions, the relative acetyl-hydroimidazolone ion abundances (Table 1 – ions **3**) were, in the time course of our reactions, much lower than the ones observed for acetyl-dihydroxyimidazolidine ions (Table 1 – ions **2**). Furthermore, the formation of an epoxy group, instead of a carbonyl one, at the arginyl guanidino group is more likely to occur in the formation of ions **3**, particularly for glyoxal and diacetyl reaction systems. Ion **4** was observed for the diacetyl reaction only (Table 2). This ion at m/z 267 revealed a fragmentation pattern including losses from the amino acid residue, similar to ions **3** in Table 3. The main loss of a water molecule, observed for ion **4** (Table 3), occurs presumably from the carboxyl group at the amino acid residue. For comparison purposes, guanidine instead of AcArg was made to react with diacetyl, as well as with another diketonic α -dicarbonyl (2,3-pentanedione), and ions structurally similar to ion **4** (protonated molecules of hydroimidazolone – H₂O) at m/z 100 (diacetyl) and 124 (2,3-pentanedione) resulted, which were identified and characterized (not shown). In the fragmentation pattern of both the latter ions, the loss of water was absent, although it was present in the fragmentation pattern of ions at m/z 128 (diacetyl) and 142 (2,3-pentanedione), structurally similar to ions **3** (protonated molecules of hydroimidazolone). In addition, in the fragmentation pattern of m/z 146 (diacetyl) and 160 (2,3-pentanedione) ions, structurally similar to ions **2** (protonated molecules of dihydroxyimidazolidine), a water molecule loss was also observed.⁵⁶ These results (not shown) provided the confirmation that loss of water molecules can occur at the guanidino moiety or at the amino acid residue, depending on the dehydration at the arginyl guanidino moiety.

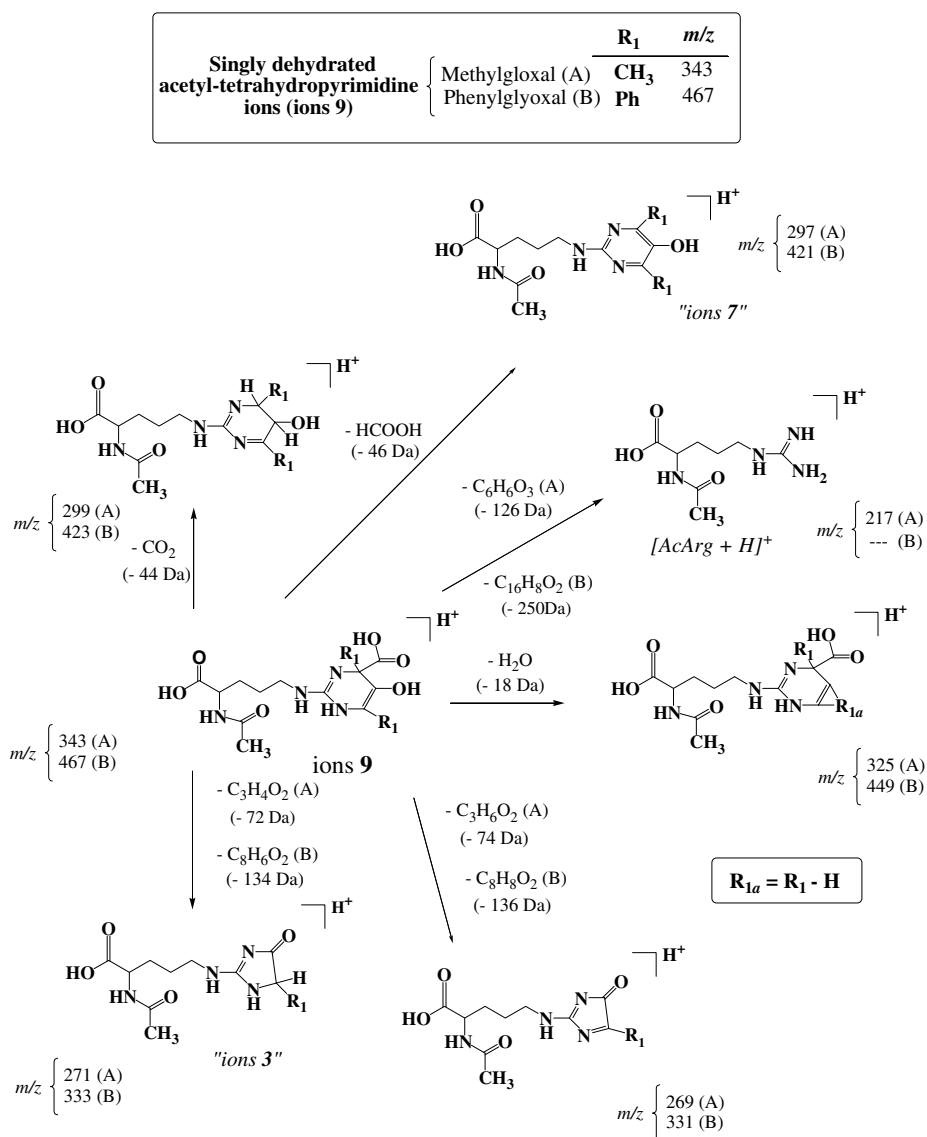
The ions at m/z 333 and 315, ions **5** and **6** (Table 1), respectively, were observed for the methylglyoxal reaction system only. In order to elucidate the ion structure attributed to these ions, ions **7** should be discussed first. The m/z 297 and 421 ions, ions **7** (Table 1), detected only for methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems, possess a fragmentation pattern similar to that of acetyl-hydroimidazolone ions, ions **3** (Tables 3 and 4 – m/z 257; 285 and m/z 271; 333, respectively). In the ESI-MS/MS spectra, the main loss was that of a water molecule. This observation argues for the presence of a stable arginyl guanidino group reaction moiety. In addition, losses from the amino acid residue were observed, similar to what occurred for ions **3** (Tables 3 and 4), and they are characteristic of the ion classes studied.^{43–45} The structure of the protonated molecule of acetyl-argpyrimidine was attributed to these ions (Table 2). It is to be noted that Al-Abed *et al.* had identified and characterized for the first time, *in vitro*, a compound named argpyrimidine.¹² Shipanova *et al.* were the first to study *in vivo* this compound.⁵⁷ The argpyrimidine ion structures (Table 2 – ions **7**) represent resonant hetero ring structures, which are relatively stable.

An expected loss from this latter ion structure would be a water molecule from the pyrimidine ring. Furthermore, the fragmentation pattern of ions at m/z 333 and 315, ions **5** and **6** (Table 1) reveals minor losses of H₂O and C₂H₄O molecules (Table 4), respectively, which accounts for the formation of relatively stable ion structures. A similarity between the fragmentation pattern of ions **5** and **6** and ion **7** (Table 4) was observed, as previously, for the fragmentation pattern of ions **2** and **3** (Tables 3 and 4). Therefore, since m/z 333, 315 and 297 ions differ by 18 Da from one another, similar to what occurs for ions **2** and **3** (Tables 3 and 4), we may postulate that ions **5** and **6** are structurally related with ion **7**, by single and double hydrations, respectively. Therefore, the structures of singly and doubly hydrated acetyl-argpyrimidine ions were attributed to ions **6** and **5** (Table 2), respectively. Furthermore, the compounds identified as ions **5** and **6** are reaction precursors of the argpyrimidine compound (ion **7**). A reason for these compounds not to have been observed in the phenylglyoxal reaction might be linked with the enhancement of the carbonyl electrophile stability by the phenyl substituents, in comparison with the methyl substituents. Such a feature would lead to dehydration and also to easier formation of the diimine intermediate on the attached reactive dicarbonyl intermediate. This seems to reinforce the contribution of the electron-donor capacity of the dicarbonyl primary substituents, either methyl or phenyl, in the formation of the reaction intermediates and products.

The m/z 361 (methylglyoxal) and 485 (phenylglyoxal) ions (Table 1 – ions **8**) and the m/z 343 (methylglyoxal) and 467 (phenylglyoxal) ions (Table 1 – ions **9**), as well as the above-mentioned ions **7**, were observed only for asymmetrical dicarbonyl reaction systems. With respect to the fragmentation pattern of ions **9**, common losses were observed from the acetyl-amino acid residue, as well as from the arginyl guanidino group moiety formed (Table 4). The latter includes CO₂, HCOOH and alkyl (methylglyoxal)/aryl (phenylglyoxal)-substituted carboxylic acids, which is indicative of the presence of a carboxyl group in a highly substituted arginyl guanidino moiety. Moreover, in the fragmentation pattern of ions **9** (Table 4) the increased number of losses from the arginyl guanidino moiety formed, together with the formation of the protonated molecule of AcArg (Fig. 1), led us to assume that the moiety formed is considerably less stable than the one we proposed for ions **7**. We concluded, therefore, that ions **9** for methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems (Table 2) possess the structure of singly dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine ions, in which the formed moiety corresponds to a substituted pyrimidine ring, as in acetyl-argpyrimidine ions (Table 2 – ions **7**). Furthermore, the fragmentation pattern of ions **8** (Table 4) revealed a major loss of a water molecule (Table 4), predicted to occur from the arginyl guanidino moiety formed. Our results, especially with respect to the THP protonated molecules at m/z 361 from the methylglyoxal reaction, are in agreement with those obtained by Oya *et al.*, where the same modified amino acid had been used.¹³ These authors had first identified this methylglyoxal-arginine adduct, the THP compound,

in the reaction of AcArg with methylglyoxal, i.e. one of the model reactions we studied, and also showed that the major fluorescent product, originally identified as 5-methylimidazolone (Fig. 3 – (III)), is argpyrimidine.¹³ To reinforce the structural assignment of ions **8** (Table 2), the similarity between ions **8** and **9** fragmentation patterns (Table 4), or more generally, between the non- and singly dehydrated ion forms, as noted e.g. for the fragmentation patterns of ions **2** and **3** (Tables 2 and 3), suggests that ions **8** possess the structure of the protonated molecules of acetyl-tetrahydropyrimidine. Interestingly, in methylglyoxal and phenylglyoxal reactions, after ion **9** loses HCOOH (Table 4), a fragment ion with a structure similar to that of acetyl-argpyrimidine ions seems to result (Table 2 – ions **7**). Also interesting is the fact that when singly dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine ions, ions **9**, for asymmetrical dicarbonyl reactions in particular, lose an α,β -unsaturated carboxylic acid molecule (Table 4) from the pyrimidine ring, acetyl-hydroimidazolone protonated molecules result

as fragment ions. Furthermore, the release from ion **9** of a more saturated substituted carboxylic acid molecule (Table 4) from the pyrimidine ring produces also a novel fragment ion, with an ion structure similar to that of the reported 5-methylimidazolone intermediate¹⁸ (Fig. 3 – (III), Scheme 1). The suggestion that the argpyrimidine compound is a degradation product of THP in solution^{13,54} is sustained by our results in the gas phase. Hence, THP compounds resulting from a degradation reaction may also have some contribution to the hydroimidazolone and derivatives, forms generated in solution, especially for asymmetrical dicarbonyl reactions (Scheme 1). These suggestions are in agreement with the ESI-MS/MS analysis performed for ions **8** and **9**, particularly for ions **9**, in which the pyrimidine ring formed is considerably less stable than other generated rings, such as imidazolone (Table 2 – ions **3**) and pyrimidine (Table 2 – ions **7**). The possible degradation of acetyl-tetrahydropyrimidine into acetyl-argpyrimidine will be assessed later, along with the discussion on dicarbonyl hydration equilibria.



Scheme 1. Main fragmentation pattern proposed for the most abundant fragment ions of singly dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine protonated molecules, ions **9**, based on ESI-MS/MS analysis, for methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems. For simplicity, fragment ions resulting from the modified amino acid residue have been omitted.

The m/z 389, 371 and 353 ions, ions **10**, **11** and **12** (Table 1), respectively, were observed for the diacetyl reaction system only. The fragmentation pattern of ion **10** includes the loss of one to three water molecules along with the loss of one to two dicarbonyl molecules (Table 3). This fragmentation behaviour suggests that a bicyclic ring of dihydroxyimidazolidine association prevails, i.e. the bis(dihydroxyimidazolidine) ion structure, instead of the THP ion formation, as noted in methylglyoxal and phenylglyoxal reaction systems (ions **8**). Moreover, ion **10** is believed to have a double dihydroxyimidazolidine ring structure, and could thus have the structure of acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) protonated molecule. The fact that the δ -ornithyl substituents (N_δ atom) in the arginyl guanidino group is the most nucleophilic⁹ deserves mention. The reaction of another diacetyl molecule at this group becomes, therefore, plausible. The bicyclic structure of ion **10** appears to contribute to minimize, to some extent, the steric hindrance given by the highest substituted diacetyl molecules. Ions **11** and **12**, at m/z 371 and 353, respectively, also observed in the fragmentation pattern of ion **10** (Table 3), were detected in the ESI mass spectra of the diacetyl reaction system (not shown). Ions **10**, **11** and **12** showed a fragmentation pattern with a similar fragment ion at m/z 267 (Table 3). This fragment ion appears to be the singly dehydrated acetyl-hydroimidazolone ion, ion **4**, also observed in the ESI mass spectra of the diacetyl reaction system (Table 2). It is assumed, therefore, that in ion **10** the loss of two water molecules appears to result from only one of the two dihydroxyimidazolidine moieties. The extensive dehydration of the bicyclic ring in ion **12** gives rise to a more pronounced fragmentation upon the amino acid residue (Table 3). The observed high relative abundance of ion **11** (Table 1) in the ESI mass spectra of the diacetyl reaction system (not shown) accounts for its high stability. It accounts also for the favourable formation of the hydroimidazolone-type moiety from the dihydroxyimidazolidine one by dehydration, as if it resulted from an asymmetrical dicarbonyl. An explanation for this could arise from the high electron-donor capacity of the amino acid side chain, where both electrophiles, developed along the dihydroxyimidazolidine association at the bicyclic ring, experience different stability. They behave as if they resulted from an asymmetrical dicarbonyl, although this is not the case. It should be emphasized that dihydroxyimidazolones are rapidly converted into hydroimidazolones, when asymmetrical dicarbonyl reactions are considered. Another explanation might be related with the high steric hindrance of the two dihydroxyimidazolidine associations at the guanidino moiety. In summary, the involvement of the N_δ can disturb the main behaviour of these dihydroxyimidazolidine associations in solution as well as in the gas-phase, and represents an aspect that deserves mentioning. Nonetheless, the δ -ornithyl substituent, which is the most nucleophilic atom of the arginyl guanidino group, is known to be involved in the formation of hydroimidazolone isomers MG-H2 and MG-H3 (Fig. 3 – (V) and (VI)) for the methylglyoxal reaction also.^{9,54}

Hydration equilibria of α -dicarbonyls and mechanistic information for the reaction products formed

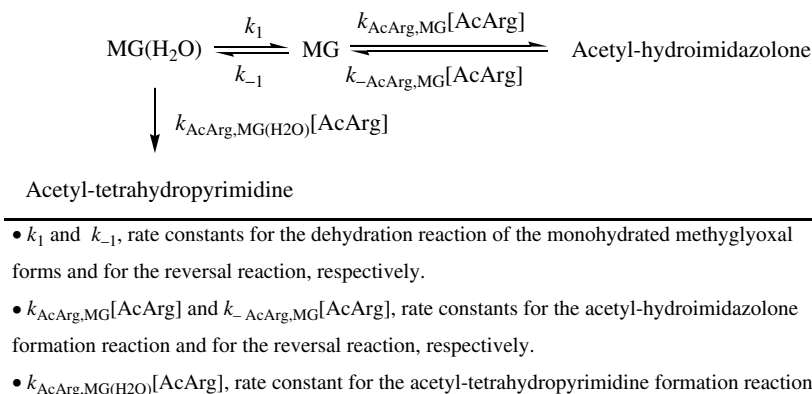
In the reaction systems studied, on the basis of the relative ion abundances observed (Table 1), the acetyl-dihydroxyimidazolidine and -hydroimidazolone compounds were the main adducts initially formed. For asymmetrical dicarbonyls, the formation of acetyl-tetrahydropyrimidine compounds as initial adducts was also observed, whereas acetyl-argpyrimidine formation occurred later. For the DA reaction, the formation of the acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) moieties initially observed was still detected after a much longer time period. The formation of these products in the methylglyoxal reaction occurs in a period of time similar to the time course of formation of methylglyoxal-derived AGEs in MG_{min}-HSA [human serum albumin (HSA) 6.6 mg/ml, exposed to a minimal content of methylglyoxal solution, 500 μ M].⁹ The glycation of HSA by methylglyoxal was also modelled by the incubation of N_α -*t*-Boc-arginine (2.4 mM) with methylglyoxal (500 μ M). In the same study, the formation of hydroimidazolone MG-H1 (Fig. 3 – (IV)), THP and a small amount of a hydroimidazolone isomer MG-H2 (Fig. 3 – (V)) was observed.⁹ Furthermore, argpyrimidine was not detected.⁹ For the reaction of a blocked arginine with methylglyoxal, several hydroimidazolone isomers, such as MG-H1, MG-H2 and MG-H3, have been identified.⁹ In that study,⁹ MG-H1 hydroimidazolone was the most stable hydroimidazolone in solution. Our results are in agreement with these findings, and in our study this compound corresponds to the m/z 271 ion [Table 2 – ion **3** (methylglyoxal)]. For asymmetrical dicarbonyls such as methylglyoxal, hydroimidazolone isomers have particular importance, and are more stable than their related dihydroxyimidazolidine isomers.

According to the literature,^{20,55} two hydroimidazolones, Glarg (Fig. 3 – (VII)) and α NFC-1 (Fig. 3 – (VIII)), have been identified in *in vitro* glyoxal reaction studies. In the present investigation, the most intense peak in the ESI mass spectra of the glyoxal reaction systems was attributed to dihydroxyimidazolidine [Table 1 – ion **2** (glyoxal)]. The dihydroxyimidazolidine isomer we identified [Table 2 – ion **2** (glyoxal)] by ESI-MS analysis seems to correspond to the reaction precursor of α NFC-1. Moreover, the hydroimidazolone observed in a low amount could correspond to a mixture of Glarg and α NFC-1 isomers. Nonetheless, Glarg is considerably less stable than α NFC-1, since it suffers the steric hindrance provided by the arginine residue. The reason why a dihydroxyimidazolone isomer is relevant in glyoxal reactions may, however, still need to be explained. The glyoxal molecule possesses two electrophiles, equally stabilized. When it reacts with two nitrogen atoms (N_ω and N_ω), of the arginyl guanidino group having similar nucleophilicity, the dicarbonyl electrophile stability at the arginyl guanidino moiety formed can be increased, but also at the same time compensated by its preserved equal stability, i.e. by the formation of dihydroxyimidazolidine [(Table 2 – ion **2** (glyoxal))]. The formation of the corresponding hydroimidazolone isomer is therefore minimized. Furthermore, in

the formation of this hydroimidazolone form, the generation of an imine intermediate at one of the hemiaminal groups of the dihydroxyimidazolidine molecule is required. Such a reaction process is difficult to occur, however, since both dicarbonyl-derived electrophiles at the imidazolidine ring are equally stabilized, and it is difficult to attribute a preference for the imine generation to one electrophile or the other. Thus, it should hardly be expected that the imine intermediate would be formed. Some reaction processes may occur, instead, at the vicinal diol. One of these reaction processes is proton abstraction from one of the methyl groups with the release of water. The other is a nucleophilic attack by the O atom (hydroxyl group) on the newly formed unsaturated bond, in order to generate the epoxy group, instead of a carbonyl group, as in α NFC-1. Furthermore, the formation of an epoxy group at the arginyl guanidino moiety formed can occur in mild basic conditions, such as the ones used in our study (pH \sim 7.5). The importance of the dihydroxyimidazolidine isomer can therefore be attributed to steric contributions from the arginyl guanidino moiety formed, rather than to energetic ones. To reinforce this, for the diacetyl reaction system similar findings were observed. In addition, in the case of the diacetyl dicarbonyl, the acetyl-hydroimidazolone formation from the imidazolidine ring (precursor ion at m/z 303, in comparison with precursor ion at m/z 285 – Table 1) does not seem to be enhanced. Therefore, contrary to expectations, even the more unstabilized dicarbonyl electrophiles in the dihydroxyimidazolidine form do not seem to favour the release of water molecules. The maintenance of the symmetrical structure for the resulting molecule due to dihydroxyimidazolidine formation seems to overcome the magnitude of the electrophile strength. That is to say, for symmetrical dicarbonyls steric aspects appear to be more important than energetic ones. In this work we have presented only two reaction times, although we studied several others (results not shown) using ESI-MS analysis, and all observations are in good agreement. In summary, for symmetrical dicarbonyls, such as glyoxal, two reaction pathways seem to lead to the formation of hydroimidazolone isomers and derivatives. When two nitrogen atoms with different nucleophilicities, such as N_δ and N_ω , at the arginyl guanidino group react with glyoxal, for example, the hydroimidazolone formation is favourable, although its observed amount is considerably low, accounting for the

steric hindrance of the arginine residue, as mentioned above. On the contrary, when two nitrogen atoms with similar nucleophilicities, such as N_ω and N_ω , are involved in the reaction with glyoxal, formation of the dihydroxyimidazolidine isomer predominates, being produced in a large amount. For asymmetrical dicarbonyls these findings are not relevant. We believe our results may help to prove that, in comparison with the asymmetrical dicarbonyls such as methylglyoxal, energetic and steric effects of symmetrical dicarbonyls enable the occurrence of a different reaction pathway for the reaction products formed. On the basis of this assumption, the physicochemical features of reactants (dicarbonyl and amine compound) appear to be extremely relevant for the interpretation of the reaction products formed, in the model reactions currently under study at least.

In an attempt to explain the reason why acetyl-argpyrimidine formation occurred at a later time course for symmetrical dicarbonyls, and the possible formation of acetyl-argpyrimidine by degradation of acetyl-tetrahydropyrimidine, the hydration equilibria of methylglyoxal and phenylglyoxal dicarbonyls and their forms were taken into consideration. Methylglyoxal exists in aqueous solution in three major forms: unhydrated, monohydrated and dihydrated. According to the literature,^{58,59} these forms are in dynamic equilibrium in the approximate ratio of ca 1:71:28. The unhydrated methylglyoxal form is more reactive than the monohydrated one, although the latter is present at a much higher equilibrium concentration.^{58,59} In the formation of acetyl-tetrahydropyrimidine compound, two monohydrated dicarbonyl molecules are involved, in which they react individually with the N_ω atoms of the arginyl guanidino group.¹³ Accounting for the high concentration of monohydrated methylglyoxal forms, it should be expected that the formation of acetyl-tetrahydropyrimidine occurs at the beginning of the incubation of AcArg with methylglyoxal. Furthermore, the degradation of the early formed acetyl-tetrahydropyrimidine does not seem to contribute to the observed high amount of argpyrimidine. In argpyrimidine formation, a reactive intermediate formed by the reaction of one unhydrated methylglyoxal molecule and one monohydrated is involved.⁵⁷ Therefore, it is likely that the dynamic equilibria of the dicarbonyl forms have been modified, since all forms normally coexist in equilibrium. Our proposal for the formation of the dicarbonyl intermediate takes into



Scheme 2. Reaction model proposed for the formation of acetyl-hydroimidazolone and acetyl-tetrahydropyrimidine compounds.

account the reversal of the acetyl-hydroimidazolone formation reaction (Scheme 2). Furthermore, by adopting a similar reaction model to the one reported for the reaction of aminoguanidine with methylglyoxal,⁵⁹ we could propose a kinetic model for the reaction of AcArg with methylglyoxal that we studied (Scheme 2).

This kinetic model would be coherent with the fact that acetyl-hydroimidazolones are acetyl-dihydroxyimidazolidines derivatives. When the concentration of AcArg diminishes critically by the formation of acetyl-hydroimidazolone, and taking into account that equimolar concentration of AcArg and methylglyoxal have been used, the reversal of the acetyl-hydroimidazolone formation reaction can become more relevant. This is the case when $k - 1 > k_{\text{AcArg, MG}}[\text{AcArg}]$, since $k - 1 > k_1$.⁵⁹ In such a way, the consumed unhydrated methylglyoxal is introduced gradually in the media. In the proposed reaction model, the methylglyoxal equilibria are re-adjusted in order to decrease the concentration of the unhydrated methylglyoxal down to a minimum value. If the reversal of the hydroimidazolone formation reaction is faster than what the hydration equilibria of dicarbonyls could account for, the dicarbonyl intermediate involved in the formation of acetyl-argpyrimidine should easily be formed and the unhydrated and monohydrated methylglyoxal forms would appear in reasonable amounts. At this point, the hydration equilibria would be disrupted and the referred dicarbonyl intermediate could be formed from a non-equilibrium condition. The fact that in methylglyoxal solution studies the referred dicarbonyl intermediate was never observed^{58,60} seems to reinforce such an assumption. The mechanistic details appear, therefore, to be plausible, and to account for the acetyl-argpyrimidine formation in a later time course. These assumptions would still be consistent when we consider that acetyl-argpyrimidine, in the reaction of AcArg with methylglyoxal, especially, was observed in a 2-week period by ESI-MS analysis. As mentioned earlier, no argpyrimidine formation was observed when a low concentration of methylglyoxal solution (500 μM) was used.⁹ Within our mechanistic considerations, the high concentration of the modified amino acid used (2.4 mM), which represents *ca* five-fold of the methylglyoxal concentration employed, should prevent the reversal of the hydroimidazolone formation reaction, since $k_{\text{AcArg, MG}}[\text{AcArg}] > k - 1$. Therefore, the introduction of the unhydrated methylglyoxal forms in the media is rendered more difficult and no argpyrimidine is formed. In a low concentration of methylglyoxal, however, the hydration equilibria favour the formation of unhydrated methylglyoxal species. Nevertheless, even in this situation the formation of the unhydrated species cannot compete with the high amount of the modified amino acid used. These reaction details can be deduced by means of the kinetic model we proposed (Scheme 2) for acetyl-hydroimidazolone formation.

With respect to the phenylglyoxal reaction, the monohydrated phenylglyoxal form also predominates over the unhydrated one, as for methylglyoxal. Moreover, the high amount of acetyl-hydroimidazolone formed rapidly disappears in the first day of incubation [Table 1 – ion 3 (phenylglyoxal)]. The latter acetyl-hydroimidazolone form being a more stabilized

compound than its related acetyl-dihydroxyimidazolidine, the formation of acetyl-argpyrimidine in the phenylglyoxal reaction was not enhanced, in comparison with what occurs for the methylglyoxal reaction. There are, therefore, several aspects that could be taken into account: (1) the reversal of the acetyl-hydroimidazolone formation reaction is not complete, and some degradation/complexation of the compound occurs; (2) the high amount of acetyl-hydroimidazolone formed, responsible for the more acidic reaction conditions observed, favours the reversal of the acetyl-hydroimidazolone formation reaction; (3) the hydration equilibria of phenylglyoxal forms supports more efficiently the introduction of new unhydrated dicarbonyl forms; and (4) the resulting dicarbonyl intermediate is more stable, and therefore acetyl-argpyrimidine formation is made more difficult. In our experiments, the three latter items (2–4) seem more probable, since no degradation/complexation species of acetyl-hydroimidazolone was observed in the ESI mass spectra. Moreover, the pH of the media dropped fast because of the formation of acetyl-hydroimidazolone, the reversal of acetyl-hydroimidazolone formation reaction being therefore favoured. These facts seem to point to a fast response from the hydration equilibria of the phenylglyoxal forms and/or an increased stability of dicarbonyl intermediate formed as the main contributors to the formation in low amount of phenylglyoxal-derived acetyl-argpyrimidine. In summary, the amount of acetyl-hydroimidazolone formed, the dynamic hydration equilibria of the dicarbonyl forms response to the new unhydrated dicarbonyl forms and the carbonyl electrophiles stability of the dicarbonyl intermediate are the main aspects that we believe should be considered in acetyl-argpyrimidine formation. In the present report, the mechanistic information provided may be useful, considering that argpyrimidine is a relevant standard in the literature. Contrary to diacetyl, glyoxal, as well as methylglyoxal and phenylglyoxal, possesses dynamic hydration equilibria in solution. Nonetheless, accounting for its distinct behaviour, the formation of acetyl-argpyrimidine, was not observed.

It is known that equally stabilized carbo-cations, as in glyoxal and diacetyl molecules, develop less different forms in aqueous media, which contributes to the formation of lesser diversity of compounds in their reactions with amine compounds. Meade *et al.* observed that diacetyl and glyoxal were less reactive at cross-linking than methylglyoxal, in a protein level study (*in vitro* conditions).^{31,39} Arginine residues modification by diacetyl, however, are thought to be a readily reversible process,^{35,36} the compounds formed lacking stability, as noted in their main fragmentation patterns. Overall, converting methylglyoxal into a more symmetrical dicarbonyl might be an important approach for controlling non-enzymatic glycation reactions.

CONCLUSIONS

In all reaction systems studied, acetyl-dihydroxyimidazolidine and acetyl-hydroimidazolone protonated molecules were observed, although some specific changes were introduced in the acetyl-hydroimidazolone ion structures (epoxy

group) and in their mechanistics, when symmetrical dicarbonyl reactions are considered. It is to be noted that for symmetrical dicarbonyls the relative ion abundances of acetyl-hydroimidazolidine protonated molecules were higher than those from their related acetyl-dihydroxyimidazolone ions. Steric aspects were therefore considered to be more relevant than energetic ones for acetyl-dihydroxyimidazolidine ions, and, especially, for the symmetrical dicarbonyl reactions. Hence, in comparison with the dicarbonyls methylglyoxal and phenylglyoxal, glyoxal and diacetyl reactivity was observed to be distinct. For the diacetyl reaction, the ions possess, in general, a more complex fragmentation pattern, with much more fragment ions than the ones observed for the dicarbonyl reaction systems studied, arguing for their lack of ion stability. Furthermore, for the diacetyl reaction, acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) ions showed important aspects, such as the involvement of the N_8 atom at the arginyl guanidino group in the reaction with the dicarbonyl, and the behaviour of the dihydroxyimidazolidine associations formed. On the basis of the fragmentation data, it was observed that dihydroxyimidazolidine associations experienced some electronic influence of the amino acid side chain, while the dicarbonyl electrophiles behaved as if they were formed from an asymmetrical dicarbonyl. Furthermore, acetyl-argpyrimidine protonated molecules were detected only in asymmetrical dicarbonyl reaction systems. For the methylglyoxal reaction system, singly and doubly hydrated acetyl-argpyrimidine ions were identified and characterized. Singly dehydrated acetyl-tetrahydropyrimidine ions for asymmetrical dicarbonyl reactions revealed in their main fragmentation patterns ions such as protonated acetyl-argpyrimidine, acetyl-hydroimidazolone and a derivative from the latter. This derivative ion, formed at m/z 269, possesses a molecular structure attributed to 5-methylimidazolone. Under gas-phase conditions, it appears that 5-methylimidazolone results from the acetyl-tetrahydropyrimidine, and not from acetyl-hydroimidazolone, as often referred to in solution studies in the literature. In all ion classes studied, the dehydrated and multiple dehydrated ion forms showed more fragmentation from the amino acid residue than from the corresponding unhydrated ones.

The formation of acetyl-hydroimidazolone for methylglyoxal and phenylglyoxal reactions seems to be related with the acetyl-argpyrimidine formation, i.e. responsible for acetyl-argpyrimidine formation in a later reaction time course. Hence, in both methylglyoxal and phenylglyoxal reactions, the amount of acetyl-hydroimidazolone formed, the dynamic hydration equilibria of the dicarbonyl-form response to the new unhydrated dicarbonyl forms introduced and the carbonyl electrophile stability of the dicarbonyl intermediate formed appear to be the main aspects that control acetyl-argpyrimidine formation.

The methodology used seems to be adequate to study these model reactions, in which most of the reaction solution products mentioned in the literature, especially for the glyoxal and methylglyoxal model reactions, were identified and characterized. Similarities were also found

between the type, amount and reaction time course we studied for the reaction products and those in the literature, particularly in so far as glyoxal and methylglyoxal dicarbonyls are concerned.^{9,30,50} For glyoxal, the high amount of dihydroxyimidazolidine we observed was in agreement with the results obtained by Cotham *et al.*, in which the authors demonstrated that glyoxal-derived dihydroxyimidazolidine (G-DH) was the primary product formed on the reaction of glyoxal with ribonuclease under physiological conditions.³⁰ The high amount of dihydroxyimidazolidine was also observed by Glomb *et al.* in *in vitro* studies, i.e. in the reaction of glyoxal with a blocked arginine.⁵⁰ In respect to the methylglyoxal reaction, hydroimidazolone and THP were the initial products we observed, whereas argpyrimidine formation occurred later. The time course of formation of these methylglyoxal-derived AGEs occurs in a period of time similar to that of formation of methylglyoxal-derived AGEs in MG_{min} -HSA (HSA 6.6 mg/ml, exposed to a minimal content of methylglyoxal solution, 500 μM).⁹ Overall, we may conclude that our results are representative of the non-enzymatic glycation processes *in vitro*.^{9,36}

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Dr Carlos Cordeiro and Prof. Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their inestimable contribution to this work. Discussions with Prof. Susana Santos are also acknowledged. One of the authors, M. Saraiva, thanks Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support (SFRH/BD/3162/2000).

REFERENCES

1. Maillard L-C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci. Ser.* 1912; **154**: 66.
2. McCance DR, Dyer DG, Dunn JA, Baiue KE, Thorpe SR, Baynes JW, Lyons TJ. Maillard reaction products and their relation to complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.* 1993; **91**: 2470.
3. Lyons TJ, Silvestri G, Dunn JA, Dyer DG, Baynes JW. Role of glycation in modification of lens crystallins in diabetic and nondiabetic senile cataracts. *Diabetes* 1991; **40**: 1010.
4. Vlassara H, Fuh H, Makita Z, Krungkrai S, Cerami A, Bucala R. Exogenous advanced glycosylation end products induce complex vascular dysfunctions in normal animals: a model for diabetic and aging complications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; **89**: 12043.
5. Vitek MP, Bhattayacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; **91**: 4766.
6. Miyata T, Oda O, Inagi R, Lida Y, Araki N, Yamada N, Horiuchi S, Taniguchi N, Maeda K. b2-Microglobulin modified with advanced glycation end products is a major component of haemodialysis-associated amyloidosis. *J. Clin. Invest.* 1993; **92**: 1242.
7. Lee K-G, Shibamoto T. Toxicology and antioxidant activities of non-enzymatic browning reaction products: review. *Food Rev. Int.* 2002; **18**: 151.
8. Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, Kornfield JA. Triosidines: novel Maillard reaction products and cross-links from the reaction of triose sugars with lysine and arginine residues. *Biochem. J.* 2003; **369**: 705. DOI: 10.1042/BJ20020668.
9. Ahmed N, Thornalley PJ. Chromatographic assay of glycation adducts in human serum albumin glycated *in vitro* by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and intrinsic fluorescence. *Biochem. J.* 2002; **364**: 15.

10. Sell DR, Monnier VM. Structural elucidation of senescence cross-link from human extra-cellular matrix: implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 21597.
11. Hayase F, Nagaraj RH, Myata S, Njoroge FG, Monnier VM. Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 3758.
12. Al-Abed Y, Misuhashi T, Ulrich P, Bucala R. Novel modifications of N_α -BOC-arginine and N_α -CBZ-lysine by methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996; **6**: 1577.
13. Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
14. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N_ϵ -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 4889.
15. Ahmed UM, Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N_ϵ -(Carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 1997; **324**: 565.
16. Konishi Y, Hayase F, Kato H. Novel imidazolone compound formed by the advanced Maillard reaction of 3-deoxyglucosone and arginine residues in proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994; **58**: 1953.
17. Hayase F, Konishi Y, Kato H. Identification of the modified structure of arginine residue in proteins with 3-deoxyglucosone, a Maillard reaction intermediate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995; **59**: 1407.
18. Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N_α -acetylarginine, N_α -acetylcysteine, and N_α -acetyllysine, and serum bovine albumin. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
19. Henle T, Walter AW, Haessner R, Klostermeyer H. Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 1994; **199**: 55.
20. Schwarzenbolz U, Henle T, Haessner R, Klostermeyer A. On the reaction of glyoxal with proteins. *Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.* 1997; **205**: 121.
21. Kevin J, Wells-Knecht KJ, Brinkmann-Frye E, Baynes JW. Characterization of an imidazolium salt formed from glyoxal and N_α -hippuryllysine: a model for Maillard reaction crosslink in proteins. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
22. Brinkmann-Frye E, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. Characterization of an imidazolium compound formed by reaction of methylglyoxal and N_α -hippuryllysine. *J. Chem. Soc., Perkin. Trans. 1* 1995; 2817.
23. Thornalley PJ, Langbord A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *Biochem. J.* 1999; **344**: 109.
24. Lacovella GM, Alderson NL, Thorpe SR, Baynes JW. The role of reactive α -dicarbonyls in AGE/ALE formation and implication in diabetic complications. *South Carolina Journal of Molecular Medicine* 2004; **5**: 73.
25. Ahmed MU, Brinkmann-Frye E, Degenhardt TP, Thorpe SR, Baynes JW. N_ϵ -(carboxyethyl)lysine, a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal increases with age in human lens proteins. *Biochem. J.* 1997; **324**: 565.
26. Murata-Kamiya M, Kamiya H. Methylglyoxal, and endogenous aldehyde, crosslinks DNA polymerase and the substrate DNA. *Nucleic Acids Res.* 2001; **29**: 3433, DOI: 10.1093/nar/29.16.3439.
27. Wells-Knecht KJ, Zyzak DV, Litchfield JE, Thorpe SR, Baynes JW. Mechanism of autoxidative glycosylation: identification of glyoxal and arabinose as intermediates in the autoxidative modification of proteins by glucose. *Biochemistry* 1995; **34**: 3702.
28. Fu M, Requena JR, Jenkins AJ, Lyons TJ, Baynes JW, Thorpe SR. The advanced glycation end product, N_ϵ -(carboxymethyl)lysine, is a product of both lipid peroxidation and glycoxidation reactions. *J. Biol. Chem.* 1996; **271**: 9982.
29. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein. A mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes by phagocytes at sites of inflammation. *J. Clin. Invest.* 1997; **99**: 424.
30. Cotham WE, Metz TO, Ferguson PL, Brock JWC, Hinton DJS, Thorpe SR, Baynes JW, Ames JM. Proteomic analysis of arginine adducts on glyoxal-modified ribonuclease. *Mol. Cell. Proteomics* 2004; **3**: 1145, DOI: 10.1074/mcp.M400002-MCP200.
31. Miller AG, Meade SJ, Gerrard JA. New insights into protein crosslinking via the Maillard reaction: structural requirements, the effect on enzyme function, and predicted efficacy of crosslinking inhibitors as anti-ageing therapeutics. *Bioorg. Med. Chem.* 2003; **11**: 843, DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00565-5.
32. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. Reactions of a modified lysine with aldehydic and ketonic dicarbonyl compounds: an electrospray mass spectrometry structure activity study. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 216.
33. Takahashi K. The reaction of phenylglyoxal with arginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 1968; **243**: 6171.
34. Grossberg AL, Pressman D. Modification of arginine in the active sites of antibodies. *Biochemistry* 1968; **7**: 272.
35. Yankeelov JA Jr. Modification of arginine in proteins by oligomers of 2,3-butanedione. *Biochemistry* 1970; **9**: 2433.
36. Yankeelov JA Jr. Modifications of arginine by diketones. *J. Methods Enzymol.* 1972; **15**: 566.
37. Gacesa P, Savitsky MJ, Dogson KS, Olavensen AH. Modification of functional arginine residues in purified bovine testicular hyaluronidase with butane-2,3-dione. *Biochim. Biophys. Acta-Enzymol.* 1981; **661**: 205.
38. Inano H, Ohba H, Tamaoki B-I. Photochemical inactivation of human placental estradiol 17 β -dehydrogenase in the presence of 2,3-butanedione. *J. Steroid Biochem.* 1983; **19**: 1617.
39. Meade SJ, Miller AG, Gerrard JA. The role of dicarbonyl compounds in non-enzymatic crosslinking: a structure-activity study. *Bioorg. Med. Chem.* 2003; **11**: 853, DOI: 10.1016/S0968-0896(02)00564-3.
40. Lapolla A, Fedele D, Aronica R, Curcuruto O, Hamdan M, Catinella S, Seraglia R, Traldi P. Investigation of the reaction between N_α -acetyl-L-lysineamide and glucose by electrospray mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995a; **9**: 69.
41. Lapolla A, Fedele D, Traldi P. The role of mass spectrometry in the study of non-enzymatic protein glycation in diabetes. *Mass Spectrom. Rev.* 2000; **19**: 279, DOI: 10.1002/1098-2787(2000)19:5.
42. Lapolla A, Fedele D, Traldi P. Diabetes and mass spectrometry. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2001; **17**: 99, DOI: 10.1002/dmrr.189.
43. Odani H, Matsumoto Y, Shinzato T, Usami J, Maeda K. Mass spectrometric study on the protein chemical modification of uremic patients in advanced Maillard reaction. *J. Chromatogr., B* 1999; **731**: 131.
44. Ahmed N, Thornalley PJ. Quantitative screening of protein biomarkers of early glycation, advanced glycation, oxidation and nitrosation in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry multiple reaction monitoring. *Biochem. Soc. Trans.* 2003; **31**: 1417.
45. Thornalley PJ, Battah S, Ahmed N, Karachalias N, Agalou S, Babaei-Jadidi R, Dawnay A. Quantitative screening of advanced glycation end products in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* 2003; **375**: 581, DOI: 10.1042/BJ20030763.
46. Pourmotabbed T, Creighton DJ. Substrate specificity of bovine liver formaldehyde dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 14240.
47. Rae C, Berners-Price SJ, Bulliman BT, Kuchel PW. Kinetic analysis of human erythrocyte glyoxalase using ^1H NMR and a computer model. *Eur. J. Biochem.* 1990; **193**: 83.
48. Kellum MW, Oray B, Norton SJ. A convenient quantitative synthesis of methylglyoxal for glyoxalase I assays. *Anal. Biochem.* 1978; **85**: 586.

49. Martins SIFS. Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. Ph.D. Thesis. Wageningen University, The Netherlands, 2003.
50. Glomb M, Lang G. Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493, DOI: 10.1021/jf001082d.
51. Iijima K, Murata M, Takahara H, Irie S, Fujimoto D. Identification of N^{ω} -carboxymethylarginine as a novel acid-labile advanced glycation end product in collagen. *Biochem. J.* 2000; **347**: 23.
52. Gruber P, Hofmann T. Chemoselective synthesis of peptides containing major advanced glycation end-products of lysine and arginine. *J. Pept. Res.* 2005; **66**: 111.
53. Odani H, Iijima K, Nakata M, Miyata S, Kusunoki H, Yasuda Y, Hiki Y, Irie S, Maeda K, Fujimoto D. Identification of N^{ω} -carboxymethylarginine, a new advanced glycation endproduct in serum proteins of diabetic patients: possibility of a new marker of aging and diabetes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; **285**: 1232, DOI: 10.1006/bbrc.2001.5322.
54. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl- N -hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N_{ϵ} -carboxymethyl-lysine- and N_{ϵ} -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
55. Paul RG, Avery NC, Slatter DA, Sims TJ, Bailey AJ. Isolation and characterization of advanced glycation end products derived from the *in vitro* reaction of ribose and collagen. *Biochem. J.* 1998; **330**: 1241.
56. Saraiva MA, Borges CM, Florencio MH, (in preparation).
57. Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. Protein modification by methylglyoxal: chemical nature and synthetic mechanism of a major fluorescent adduct. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **344**: 29.
58. Kalapos MP. Methylglyoxal in living organisms chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol. Lett.* 1999; **110**: 145.
59. Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with α -oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem. Pharmacol.* 2000; **60**: 55, DOI: 10.1016/S0006-2952(00)002887-2.
60. Nemet I, Viki-Topić D, Varga-Defterdarović L. Spectroscopic studies of methylglyoxal in water and dimethylsulfoxide. *Bioorg. Chem.* 2004; **32**: 560, DOI: 10.1016/j.bioorg.2004.05.008.

7.1.2. Conclusões.

Antes de se proceder à descrição dos resultados obtidos, sob o ponto de vista do comportamento das espécies em solução e da sua reactividade, far-se-á uma breve contemplação de aspectos da fragmentação dos iões de interesse, detectados no espectro de massa ESI, para os sistemas reaccionais em causa.

Os iões de interesse identificados, no espectro de massa ESI, não são comuns aos sistemas reaccionais estudados, com a excepção das moléculas protonadas de acetil-dihidroxiimidazolidina e de acetil-hidroimidazolona, as quais foram identificadas em todos os sistemas reaccionais. Todavia, existe uma notória semelhança entre o tipo de iões detectados para os sistemas reaccionais dos dicarbonilos simétricos (glicoxal e diacetil) e assimétricos (metilglicoxal e fenilglicoxal). Relativamente aos padrões de fragmentação dos iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, verifica-se que, para cada classe de iões (e correspondentes formas de iões desidratadas, a uma e a duas moléculas de água), na fragmentação de iões não desidratados apenas são produzidos iões fragmento relativos aos agregados formados no grupo arginil da acetil-arginina. Na fragmentação de iões desidratados, para qualquer nível de desidratação, tem-se a produção de iões fragmento a partir do resíduo do aminoácido modificado e, por vezes, embora numa menor amplitude, também do agregado formado no grupo arginil da acetil-arginina. Um resultado interessante, neste estudo, prende-se com a fragmentação das moléculas protonadas de tetrahidropirimidina, desidratadas a uma molécula de água, para os sistemas de reacções dos dicarbonilos metilglicoxal e fenilglicoxal, em que se detectaram iões fragmento, correspondentes às moléculas protonadas de acetil-argpirimidina, acetil-hidroimidazolona, e do derivado acetilado de 5-metilimidazolona. Os dois primeiros iões fragmento referidos foram também observados ao nível do *fullscan*, ao passo que o último ião fragmento referido corresponde a um produto de reacção reportado na literatura [1], ao nível das reacções da arginina; em que se assume que tenha sido erroneamente atribuído [2], por confusão com o composto de argpirimidina formado, nas reacções da arginina com metilglicoxal. Muito embora este facto, não deixa de ser interessante constatar que, ao nível da fragmentação do ião tetrahidropirimidina mono-desidratado, tenham sido identificados uma variedade de iões fragmento, que se traduzem na estrutura de produtos de reacção efectivos. Situações como esta, realçam, na verdade, a importância dos resultados obtidos na fragmentação dos compostos identificados, no espectro de massa ESI, para

compreensão da interpretação dos processos de reacções envolvidos nos sistemas reaccionais em causa.

Observou-se, em todos os sistemas de reacções estudados para a acetil-arginina, a formação dos compostos de acetil-dihidroxiimidazolidina e de acetil-hidroimidazolona. Estes compostos, em particular o primeiro, correspondem ao produto de reacção formado, num período muito inicial das reacções da acetil-arginina. Estruturalmente, os compostos de acetil-hidroimidazolona revelam-se distintos para os sistemas de reacções dos dicarbonilos simétricos (glioal e diacetil) e assimétricos (metilglioal e fenilglioal). Esta diferença faz-se notar na formação do grupo epóxido nos sistemas de reacções dos dicarbonilos simétricos, ao invés da presença do grupo carbonilo nos sistemas dos dicarbonilos assimétricos. Um aspecto interessante, neste estudo, reside na elevada abundância relativa das moléculas protonadas de acetil-dihidroxiimidazolidina, no espectro de massa ESI, em comparação com a abundância observada para as moléculas protonadas de acetil-hidroimidazolona, no que respeita à reacção dos dicarbonilos simétricos glioal e diacetil, em particular do glioal. Aliás, este resultado, relativo a um grande aumento da formação do composto de dihidroxiimidazolidina face ao composto de hidroimidazolona, fora observado por Glomb e Lang [3], na sequência de estudos realizados *in vitro*, incluindo a reacção de uma arginina modificada com glioal. Cotham et al. [4] notaram uma formação significativa do composto de dihidroxiimidazolidina, na modificação da ribonuclease pelo glioal, em condições fisiológicas. Os resultados obtidos no presente estudo, concordantes com os da literatura [3,4], levaram a concluir que efeitos de equivalência energética dos centros electrofílicos das moléculas de dicarbonilo poderão estar na base da diferença de reactividade entre as formas de dicarbonilo seleccionadas. Deduz-se, assim, que quando os dois centros electrofílicos da molécula de α -dicarbonilo possuem uma energética equivalente, como no caso dos dicarbonilos glioal e diacetil, ao reagirem com o grupo arginil do aminoácido arginina poderá resultar a formação de um produto de condensação inicial, i.e. a formação do diol vicinal (dihemiaminal) estável, e/ou na formação preferencial de um produto de reacção duplamente desidratado. Se os centros electrofílicos na molécula de dicarbonilo, com uma mesma energética, se encontrarem numa forma mais estabilizada, como no caso do glioal, pode não haver tendência para a desidratação do agregado de dihidroximidazolidina formado, no grupo arginil da acetil-arginina. Isto acontece uma vez que um processo de reacção que contribua para a menor desestabilização dos centros electrofílicos das moléculas de

glioxal reagidas, e.g. desidratação a uma molécula de água, pode conduzir à perda da equivalência energética entre os dois centros electrofílicos na molécula de glioxal, o que pode não ser energeticamente favorável. Na verdade, foi proposta, neste estudo, a estrutura do composto de acetil-hidroximidazolona, para a reacção do glioxal com acetil-arginina, com o envolvimento do grupo epóxido, ao invés do grupo dicarbonilo, embora possa, de facto, existir a formação de ambos os grupos, que conduzem certamente a compostos distintos, ficando a sua proporção dependente da contribuição de determinados factores de natureza estérica e energética das espécies envolvidas na reacção. Na reacção do dicarbonilo simétrico diacetil, tem-se a formação inicial significativa do composto de acetil-dihidroximidazolidina que resulta, consequentemente, no desenvolvimento de formas desidratadas do composto referido, desidratadas a uma e a duas moléculas de água. Como os centros electrofílicos na molécula de diacetil reagida estão menos estabilizados, em comparação com os da molécula de glioxal, a barreira energética envolvida não é tão significativa, de modo a inviabilizar a formação efectiva da espécie duplamente desidratada do composto de acetil-dihidroxiimidazolidina. Neste caso, a desidratação a duas moléculas de água do composto de acetil-dihidroxiimidazolidina conduz a um acréscimo da estabilização dos centros electrofílicos da molécula de diacetil reagida. Apesar da reactividade dos dicarbonilos simétricos e assimétricos ser distinta, como se pôde constatar na descrição estabelecida até este ponto, a reactividade das formas de dicarbonilo simétricas, glioxal e diacetil, também apresenta diferenças significativas. Na reacção da acetil-arginina com diacetil, observou-se a formação de uma classe de compostos, de acetil-bis(dihidroxiimidazolidinas), que não foi observada em nenhum outro sistema reaccional investigado no presente estudo. Estes compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) têm, na sua reacção de formação, o envolvimento do átomo de N_δ do grupo arginil da acetil-arginina (i.e. o átomo de azoto mais nucleofílico), com a formação de dois anéis de dihidroxiimidazolidina no referido grupo arginil. Na desidratação do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), parece existir indicação da influência do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina no processo de reacção, concluindo-se, assim, que a eliminação de uma e de duas moléculas de água se processam ao nível do anel de imidazolidina formado, próximo do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina. Para os sistemas dos dicarbonilos assimétricos metilglioxal e fenilglioxal, foram identificados os compostos de tetrahidropirimidina e de argpirimidina, e de suas respectivas formas desidratadas e hidratadas. Ainda neste

estudo, foi estabelecido, com base em resultados obtidos e resultados da literatura [5], para a reacção do metilglioxal e do fenilglioxal com arginina, que a formação do composto de acetil-argpirimidina está relacionada com a formação do composto de acetil-hidroimidazolona, na tentativa de se interpretar a formação do composto de acetil-argpirimidina para um tempo de reacção tardio, em geral para um tempo de reacção posterior à formação do composto de acetil-dihidroxiimidazolidina. Com a elaboração de uma proposta mecanística para a formação de acetil-argpirimidina via acetil-hidroimidazolona, concluiu-se que a quantidade de acetil-hidroimidazolona formada, a resposta do equilíbrio de hidratação face à introdução de formas de dicarbonilo não hidratadas, e a estabilidade dos electrófilos dicarbonílicos no intermediário envolvido na formação do composto de acetil-argpirimidina, se traduzem como os factores responsáveis para o controlo da formação do composto de acetil-argpirimidina. No que respeita à reacção do metilglioxal, verificou-se que o tipo de produtos formados e a extensão da reacção em causa se assemelham francamente com a modificação da albumina do soro humano, por exposição a uma quantidade mínima de metilglioxal *in vitro* [6]. Assim sendo, é possível enfatizar a importância das reacções modelo, que envolvem compostos de baixo peso molecular, no estudo dos processos de glicação. É possível também sublinhar a importância da metodologia adoptada neste estudo para assistir e complementar a informação obtida de estudos em solução para os sistemas reaccionais em questão e sistemas relacionados.

7.1.3. Bibliografia.

- [1] Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
- [2] Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
- [3] Glomb M, Lang G. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493.
- [4] Cotham WE, Metz TO, Fergunson PL, Brock JWC, Hinton DJS, Thorpe SR, Baynes JW, Ames JM. *Mol. & Cell. Proteomics.* 2004; **3**: 1145.
- [5] Thornalley PJ, Yurek-George A, Argirov OK. *Biochem. Pharmacol.* 2000; **60**: 55.
- [6] Ahmed N, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **364**: 15.

7.2. Um estudo de espectrometria de massa de electrospray para as reacções da acetil-arginina com α -dicarbonilos dicetónicos – evidência para uma modificação específica da arginina.

Para além da importância dos compostos de α -dicarbonilo na modificação dos resíduos básicos das proteínas, como os resíduos de lisina e de arginina (entre outros), no contexto da reacção de Maillard, e, de uma forma mais estrita, na glicação, a modificação química dos resíduos de arginina, em proteínas e em enzimas, por exemplo, por compostos α -dicarbonilo dicetónicos, em particular pelo diacetil, é conhecida desde do início dos anos sessenta, do século XX [1–5]. A modificação dos resíduos nas proteínas e enzimas, por reacção com compostos α -dicarbonilo dicetónicos, consiste num método simples, empregando condições suaves, e compatíveis com as condições fisiológicas [1,2]. Foi reconhecido desde os primeiros estudos realizados, e que promoveram uma extensão considerável do assunto nas duas décadas seguintes, no que respeita ao contexto da modificação de proteínas e de enzimas, que os compostos α -dicarbonilo dicetónicos, como o diacetil, são extremamente selectivos para com os resíduos de arginina nas referidas moléculas biológicas [6]. Com estes estudos verificou-se ainda que a utilização de vários α -dicarbonilos, para a modificação dos resíduos de arginina, deu provas de que os grupos arginil desempenham um importante papel na função de determinados enzimas, quando da sua interacção com substratos aniónicos e coenzimas [7,8]. O uso emprego de vários α -dicarbonilos revelou ser surpreendentemente selectivo para os resíduos de arginina localizados ao nível do centro reactivo de muitas biomoléculas, em especial, e como já fora referido, ao nível da interacção aniónica com determinados ligandos, verificando-se, na maioria dos casos, a perda da actividade do enzima apenas pela modificação de um único resíduo de arginina [6]. Além disso, verificou-se igualmente que os resíduos de arginina, localizados ao nível do centro activo de enzimas, em particular, reagem mais rapidamente com as formas α -dicarbonilo, em comparação com a correspondente reacção do aminoácido arginina na sua forma livre [9–11]. Deste modo, não só os compostos α -dicarbonilo se mostravam selectivos para com os resíduos de arginina, com também existe evidência clara de que os resíduos de arginina localizados nos centros activos de biomoléculas são os mais propensos para tal modificação, o que reforça a eficácia da metodologia

desenvolvida. Apesar da incontestável selectividade da reacção dos compostos de α -dicarbonilo para com determinados resíduos de arginina específicos em proteínas e enzimas, que contribuiu para a compreensão do mecanismo de acção de determinados enzimas e ainda para a reunião de informação estrutural sobre as moléculas biológicas modificadas, verifica-se que as propostas mecanísticas estabelecidas, para a modificação química dos resíduos de aminoácidos pelos α -dicarbonilos, embora parecendo razoáveis, não foram, na verdade, rigorosamente estabelecidas. Isto compreende-se perfeitamente numa análise preliminar dos trabalhos desenvolvidos nas décadas de sessenta e de setenta, do século XX [1–11]. Com o desenvolvimento de técnicas analíticas, como a espectrometria de massa, em particular das técnicas de ionização suave, como electrospray [12–16] e MALDI [17], que tiveram a sua génese num período de tempo efectivamente posterior aos referidos estudos de modificação das proteínas e de enzimas pelos α -dicarbonilos, este cenário poderia ter um contorno completamente diferente. Na verdade, este tipo de metodologias usadas no passado caíram um pouco em desuso, na medida em que com o desenvolvimento das técnicas analíticas existentes e com a introdução de novas técnicas analíticas abriu-se todo um novo horizonte para estudo das moléculas biológicas, deixando muita vezes de ter sentido prático o recurso a metodologias para a modificação específica de biomoléculas, o que, por vezes, o seu recurso ainda complica mais os estudos e a obtenção de resultados definitivos. Isto acontece uma vez que ao estimular-se a ocorrência de determinadas reacções em sistemas, já por si complexos, como é o caso da modificação de proteínas e de enzimas, se introduz uma nova série de factores que aumentam a complexidade dos sistemas, não fazendo, portanto, grande sentido o seu recurso, com os meios de que actualmente se dispõe, em termos de técnicas e de metodologias analíticas, salvo, obviamente, determinadas situações. Situações essas que ainda recorrem a metodologias de modificação química de proteínas e de enzimas, embora num contexto mais restrito, e em situações práticas mais controladas e previstas, que contemplam o aumento da complexidade dos sistemas, por si já relativamente complexos [18].

No presente capítulo, optou-se pelo estudo da reacção da acetil-arginina com um conjunto de α -dicarbonilos dicetónicos seleccionados, com intuito de se explorar as modificações químicas envolvidas nos resíduos de arginina pela acção dos compostos α -dicarbonilo seleccionados, tendo em consideração a possível importância das modificações envolvidas no contexto da glicação. É de salientar que as modificações

dos resíduos de arginina com os compostos α -dicarbonilo dicetónicos têm sido sugeridas como sendo completamente reversíveis [19,20], o que reforça ainda o propósito do estudo realizado. Assim, com base no estudo da reactividade da acetil-arginina com os α -dicarbonilos dicetónicos seleccionados é possível verificar a viabilidade da metodologia da modificação química de resíduos arginina em proteínas e enzimas pelos compostos α -dicarbonilo, desenvolvida desde o início dos anos sessenta, e em conjugação aplicar os resultados obtidos para o contexto da glicação, uma vez que as modificações envolvidas são de natureza completamente reversível e compreendidas não só em condições fisiológicas. Talvez que compreendendo-se melhor este tipo de modificações envolvidas se possa realçar a sua importância ou desenvolver algum contexto que justifique primeiramente a necessidade da sua aplicação prática.

7.2.1. Objectivos.

O presente estudo que compreende a reactividade do composto acetil-arginina com um conjunto de α -dicarbonilos dicetónicos (1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona), constitui uma continuação dos estudos anteriores, sobre a reactividade das formas modificadas dos aminoácidos lisina e arginina. Com o presente estudo pretende-se (i) identificar e caracterizar reagente e produtos de reacção, para os sistemas reaccionais em causa, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa de electrospray, (ii) tentar estabelecer alguma relação para as propostas de estruturas estabelecidas para os produtos de reacção detectados, com as propostas existentes na literatura, em particular para as reacções dos compostos de α -dicarbonilo dicetónicos, (iii) utilizar alguma informação espectral, em particular no que respeita às abundâncias iónicas dos iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, para assim reunir informação adicional sobre os sistemas reaccionais em estudo, (iv) propor um mecanismo de reacção para formação dos produtos de reacção identificados, (v) reunir a possível informação estrutural, cinética e mecanística, no sentido de interpretar a reversibilidade dos sistemas de reacções em causa, e enquadrar esta informação no contexto da glicação, ou melhor, no contexto do controlo e inibição da glicação, e, numa forma mais ampla, na modificação de biomoléculas.

An electrospray mass spectrometry based study of acetyl-arginine reactions with diketonic α -dicarbonyls – evidence for a specific arginine modification.¹

ABSTRACT

The modification of arginine residues, by diketonic α -dicarbonyls, in structural proteins and enzymes, is a known process. The chemistry of these reaction processes is however not fully understood. Considering that electrospraying analyte solutions, most of the solution behaviour can be preserved, we have studied the reactions of acetyl-arginine with diketonic α -dicarbonyls by means of electrospray ionization mass spectrometry. The species formed in these reactions are here presented for the first time. Compounds of two different classes were identified, namely acetyl-dihydroxyimidazolidines and acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines), and their dehydrated species. The former compounds are known to exist in solution. MSⁿ experiments, for ions belonging to each class assigned, revealed that precursor ions fragmentation behaviour, is consistent with reaction moieties stability, developed in the reacted arginyl group. Furthermore, acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, in particular, were detected throughout a long reaction time period, in comparison to the remaining compounds identified. Since dehydration appears to be reinforced in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) chemistry with respect to acetyl-dihydroxyimidazolidines chemistry, and that both structurally related compounds involve mostly dihemiaminals reactivity, we decide to approach their mechanistics. In addition, two different ion structures were proposed for acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, concerning the

¹ Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* (aceite para revisão).

two more symmetrical and two more asymmetrical dicarbonyl systems. In acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) formation, we concluded that the importance of single dehydration relies on rapid minimization of sterics and energetics of reaction moieties formed, which also occurs in a selective way, regarding the two compound structures proposed for bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O. This latter behaviour was determined on basis of acetyl-arginine residue energetic/steric influences occurring on the nearest imidazolidine ring located, at acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) structures. Since single dehydration appears to govern acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O formation, favourable dehydration reversal reaction responses can occur, and epoxy groups can easily interchange to their dihemiaminals, in slightly acidic or basic media. A very specific modification of arginine residues seems to arise.

KEYWORDS: acetyl-arginine; diketonic α -dicarbonyls; electrospray ionization mass spectrometry; dihemiaminal; reversible arginine modification.

INTRODUCTION

The modification of arginyl side-chains of proteins, by diketonic dicarbonyls, is well known, even under non-physiological conditions.¹⁻³ Nevertheless, from the chemical point of view, the reaction processes involved, as well as the reaction species formed, are not yet fully understood. Diketonic dicarbonyls are often used in the modification of basic amino acid residues, i.e. arginine and lysine, present in enzymes and structural proteins.⁴ Diacetyl in particular, was found to inactivate several enzymes in their specific substrates.^{5,6} This compound was also found to be determinant for specific protein sites of coordination.¹⁻³ Arginine residues modification by diacetyl, is thought to be a readily reversible reaction process.^{3,7} Furthermore, the reaction of proteins arginine residues, with sugars and α -dicarbonyls, under physiological conditions, named glycation, has a leading role in the comprehension of pathological mechanisms associated with diabetic complications, long-term microvascular and macrovascular diseases,⁸⁻¹¹ Alzheimer's disease,^{12,13} and aging.^{8,9,14} In these reactions, the formation of end-stage adducts, the so-called AGEs (advanced glycation end-products), causes severe modifications in the structure and function of reacted proteins. Modifications of long-lived proteins, such as collagen and lens crystallin, among others, are good examples of the relevance of glycation *in vitro* and *in vivo*.^{8,9} The reaction processes involved in glycation, are complex, and can be described by the Maillard reaction.¹⁵ The complexity of these reaction processes is also responsible for the formation of structurally different AGEs. An important number of AGEs is formed directly by the reaction of protein's arginine residues, with intracellular α -dicarbonyls, such as glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxyglucosone and glucosone.¹⁶ Compounds structurally identical to AGEs have also been found to be formed in the model reactions of acetyl-arginine and acetyl-lysine, with glyoxal and methylglyoxal.¹⁷⁻²¹ Indeed, these

latter model compound reactions have been found to correlate with the corresponding reaction processes *in vivo*.^{17–21} With this in mind, and knowing that dicarbonyl molecules are extremely versatile in their reaction with amines, a study concerning the functionality of the dicarbonyl molecules in their reaction with acetyl-arginine was carried out. The reactions of blocked arginine (N_α -acetyl-L-arginine; acetyl-arginine) with several diketonic dicarbonyls [1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione] (Fig. 1) have been studied, aiming also to better understand the reversible nature of the modification of arginine with diketonic dicarbonyls, as well as to probe the reaction mechanism involved. Knowing that electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) and its *tandem* version ESI-MS/MS are rapidly becoming the techniques of choice for solution mechanistic studies, in chemistry and biochemistry,²² as well as in high-throughput screening of homogenous catalysis reactions,²³ these techniques were selected to monitor the reaction of acetyl-arginine with the selected diketonic dicarbonyls, and to identify and characterize intermediates and reaction products.

In a previous study,²⁴ attempting to determine a relation between solution and gas phase behaviour of analyte species under ESI-MS conditions,^{25,26} an increase in the ESI-MS analyte ion abundances it was observed, by electrospraying analytes solutions with 10^{-3} M HEPES buffer (solutions of two components: analyte + electrolyte). This effect occurred, in particular, for high concentrated analyte solutions, in comparison to the corresponding analyte solutions with a lower HEPES buffer concentration. The results obtained seem to agree with the ones reported by Constantopoulos et al., in the course of an investigation concerning the study of the effect of salt concentration on analyte response under ESI-MS conditions, and with the application of the partitioning equilibrium model.²⁷

Aspects concerning the reactivity of acetyl-arginine with diacetyl, in particular, are approached, in order to better elucidate some features related to the reactivity of diketonic dicarbonyls.²¹

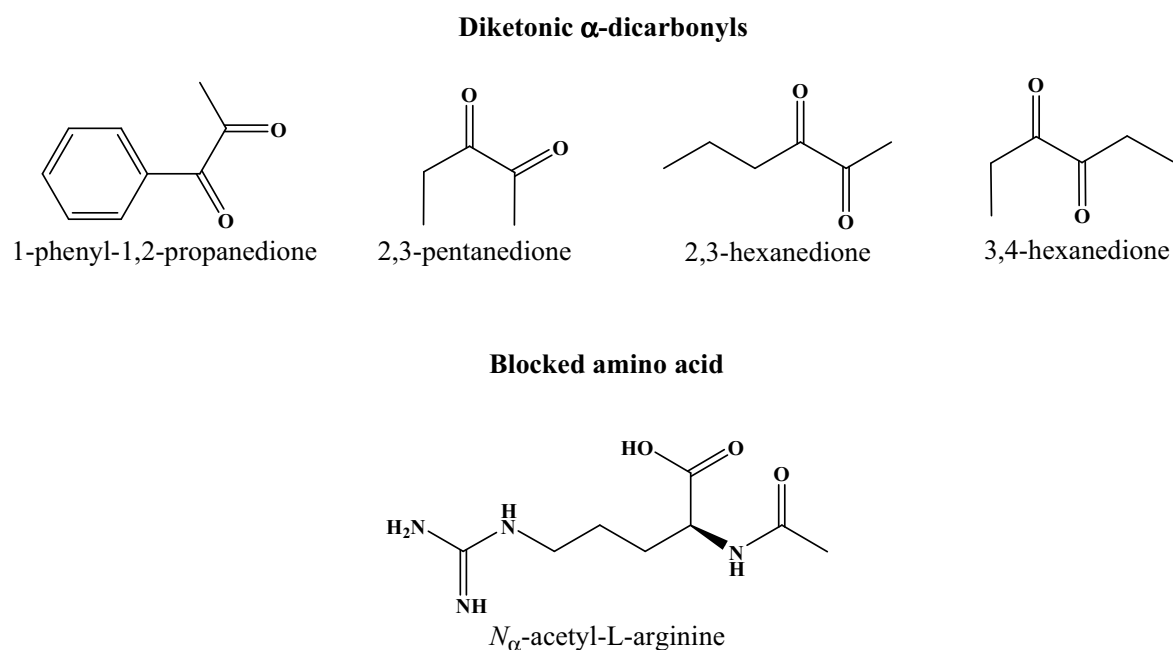


Figure 1. Chemical structures of α -dicarbonyls and of the blocked amino acid.

EXPERIMENTAL

Materials

The blocked amino acid, N_{α} -acetyl-L-arginine, the diketonic dicarbonyls, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione, and the sulfonic buffer 4-(-2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium salt (HEPES sodium salt), were purchased from Sigma Chemical. The organic solvent methanol (HPLC p.a.) was from Merck. Ultrapure deionised water (18.2 M Ω .ms) was also used in the preparation of solutions and reaction mixtures, generated in a Milli-Q plus system. Concentrated solutions of sodium hydroxide (NaOH) (solid pellets from Merck) and hydrochloric acid (HCl) (Riedel-de Haën) were employed to adjust pH media. All chemicals used were of the highest quality available.

Preparation of reaction mixtures

In the reaction mixtures preparation, the blocked amino acid acetyl-arginine solution (200 mM), as well as the diketonic dicarbonyls 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione solutions (200 mM), were prepared by dissolving the compounds individually in a previously prepared HEPES buffer solution (200 mM). The solutions pH was then adjusted to 7.5. Subsequently, 1.5 mL of the buffered amino acid solution was added to 1.5 mL of the dicarbonyl buffered solution, in a total volume of 3 mL. After adding the dicarbonyl compounds, the solutions were maintained incubated at 70 °C, in a stove (Memmert, model 1500), under air and in the dark, for 28 days. The buffered solutions of 1-phenyl-1,2-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione dicarbonyls were prepared in methanol : water; 60 : 40 (v/v), accounting for their lack of solubility in water. Furthermore, aliquots of

100 μ L were taken, at fixed time periods, and immediately frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (short time periods).

After adding the dicarbonyl compound, the solution reaction took place, and in the course of the reaction, pH slightly decreased. Thus, in the first four hours, the pH of all reaction mixtures was adjusted, which was sufficient to maintain the acceptable range of $7.0 \leq \text{pH} \leq 8.0$, i.e., 0.5 pH unit difference.

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis were performed on an LCQ Duo ion trap mass spectrometer equipped with an ESI source. The source was maintained at a voltage of 4.5 kV, and coaxial and auxiliary gases (both nitrogen) were applied, with corresponding flow-rates of *ca.* 20 psi. A voltage of *ca.* 10 V and a temperature of 220 $^{\circ}\text{C}$ were applied to the capillary and maintained during the experiments. The pressure (capillary/skimmer region), measured with the convectrom gauge during electrospray experiments, was normally *ca.* 0.92 torr. In the mass analyser region, the base pressure, measured with the ion gauge, was *ca.* 1.12×10^{-5} torr. The stored samples were 200 times diluted, in ultra pure water, and mass spectra were recorded. Samples were introduced directly in the ESI source at a flow-rate of 5 $\mu\text{L}/\text{min}$. The mass range used was m/z 50 – 1000 and positive ion mode was selected for the experiments. The recorded mass spectra were based on one minute acquisition, while the mass spectrometer operated using three microscans with a maximum ion injection time of 50 ms (default values).

In the ESI-MS² experiments selected, precursor ions were isolated in the ion trap and forced to collide with helium gas. A collision energy of 20–50 % of the maximum available collision energy was applied to the ionic species selected. Total ion current

was maintained above 5×10^3 in all cases. When the MS² analysis was not conclusive for precursor ions structure attribution, MS³ experiments were carried out, for the precursor ions with higher molecular weights, in particular. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 200 ms (default values), and the recorded mass spectra were also based in one minute acquisition.

Reaction systems and ESI-MS analysis were performed in duplicate. ESI-MSⁿ spectra were repeated two to three times.

RESULTS AND DISCUSSION

ESI mass spectra

The ESI mass spectra of aliquots of reaction solutions of acetyl-arginine with diketonic dicarbonyls 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione, at selected reaction times, were recorded, exhibiting little or no fragmentation. This can be seen in the illustrated ESI mass spectra for 1-phenyl-1,2-propanedione and 2,3-hexanedione reaction systems (Fig. 2). The peaks observed were mostly protonated reactant and reaction products molecules, i.e. $[M + H]^+$, and buffer ions. The m/z values for these protonated molecules, and corresponding ion abundances, are presented in Table 1, for all reaction systems studied. Ion abundances were normalized to m/z 261 buffer ions abundance, and determined at two different reaction times. On basis of ESI-MSⁿ analysis, ion species in the ESI mass spectra were also identified and characterized for the reaction systems studied. Ion structures for these ions of interest were proposed, as shown in Table 2. When ion structures attribution by means of ESI-MS² was not conclusive, ESI-MS³ analysis of the higher molecular weight reaction products was performed. For clarity, ions of interest from the reactions mixtures studied, identified in the ESI mass spectra, were grouped in two main classes (classes **a** and **b**), according to their structural similarity.

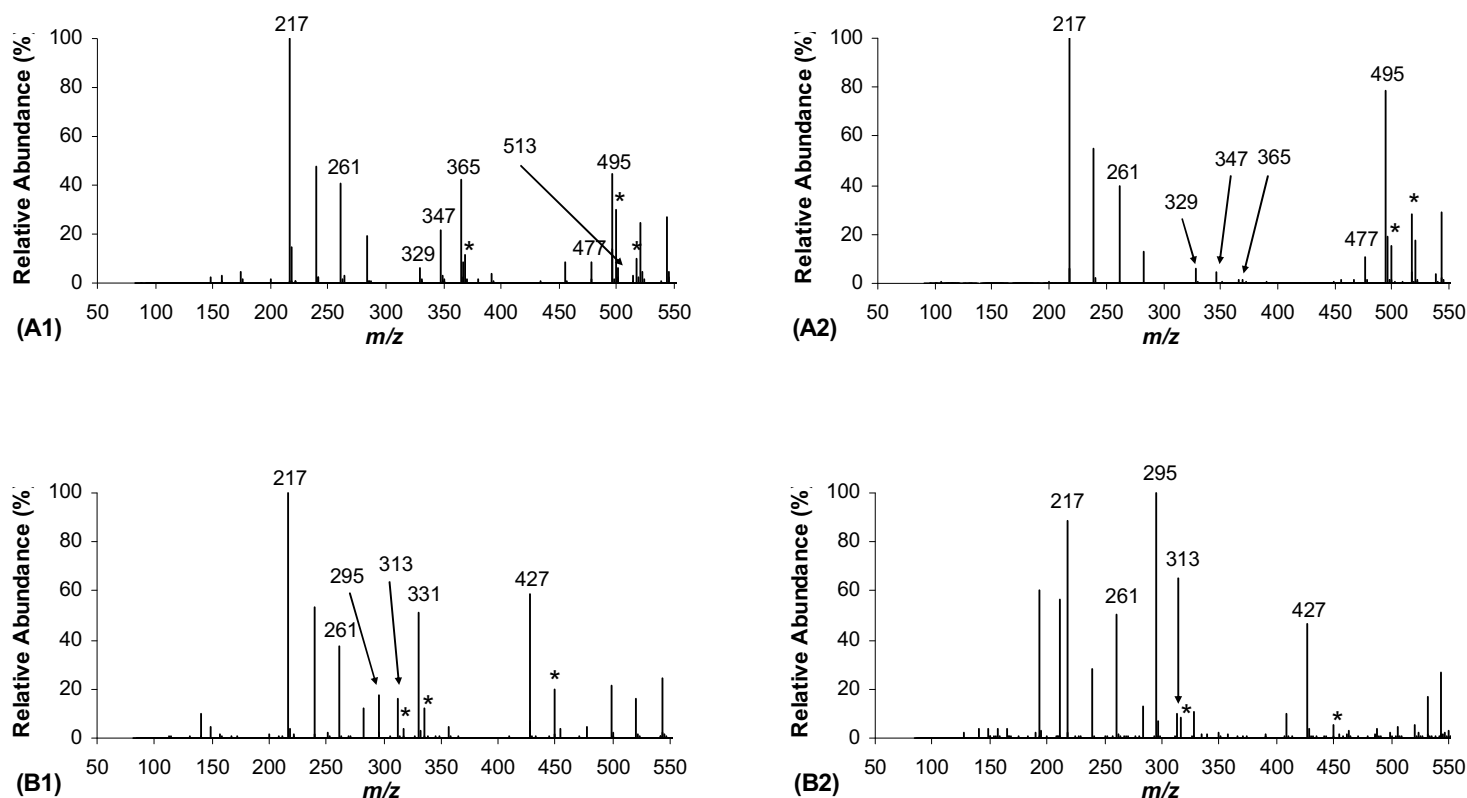


Figure 2. ESI mass spectra obtained for aliquots of the reaction systems solutions: (A) 1-phenyl-1,2-propanedione and (B) 2,3-hexanedione. A1 and B1: 5 min; A2 and B2: 1 day. The m/z values assigned refer to singly protonated reaction product molecules. Exceptions are m/z 217 and 261 ions, which correspond to singly protonated molecules of acetyl-arginine (reactant) and HEPES (buffer compound), respectively. Ions assigned with an asterisk refer to singly sodiated reaction products.

Table 1. Identified compounds based on ESI-MS analysis and corresponding normalized relative ion abundances, at two different reaction times, for 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione reaction systems.

Ions of Interest	Reaction systems	
	(acetyl-arginine + 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione)	
	m/z [M + H] ⁺ [Rel. abundance (%)]	
	1-Phenyl-1,2-Propanedione	2,3-Pentanedione
acetyl-arginine (1)	217 (243; ^a 253 ^b)	217 (220; ^a 124 ^b)
acetyl-dihydroxyimidazolidine (1a)	365 (103; 4.8)	317 (149; c)
acetyl-hydroimidazolone (2a)	347 (52.3; 11.1)	299 (51.1; 1.9)
acetyl-dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O (3a)	329 (14.6; 16.2)	281 (35.7; 83.7)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) (1b)	513 (6.8; c)	417 (1.5; c)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – H ₂ O (2b)	495 (110; 200)	399 (117; 54.2)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H ₂ O (3b)	477 (20.0; 26.8)	d
	2,3-Hexanedione	3,4-Hexanedione
acetyl-arginine (1)	217 (268; ^a 176 ^b)	217 (239; ^a 199 ^b)
	331 (138; 0.5)	331 (23.2; 0.5)
acetyl-dihydroxyimidazolidine (1a)	313 (42.9; 20.0)	313 (27.9; 4.0)
acetyl-hydroimidazolone (2a)	295 (48.0; 198)	295 (79.5; 245)
acetyl-dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O (3a)	445 (1.1; c)	d
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) (1b)	427 (159; 92.2)	427 (49.2; 20.8)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – H ₂ O (2b)	d	d
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H ₂ O (3b)		

Reaction time ^a 5 min. ^b 1 day. c Relative ion abundance < 0.5 %. d Not detected.

Relative ion abundances are normalized to m/z 261 ions of the HEPES buffer compound and a relative ion abundance of 100 % was always attributed to these buffer ions.

Identification and characterization of reaction products formed.

The ions belonging to class **a** (Table 1), i.e. ions **1a**, **2a** and **3a**, were identified in all reaction systems studied, and they differ by 18 Da with respect to their mass/charge ratio observed in the ESI mass spectra. The fragmentation experiments performed on class **a** ions, revealed that in ions **1a**, losses occurred in the reaction moieties formed in the arginyl group, of the blocked amino acid acetyl-arginine, namely one and two water molecules, and one dicarbonyl molecule, with formation of protonated acetyl-arginine molecules as fragment ions. In ions **2a** and **3a** fragmentation, the behaviour was somehow distinct from the one described for ions **1a**. Thus, losses from ions **2a** and **3a**, for the former especially, occurred from reaction moieties formed in the arginyl group and from the amino acid residue as well. For ions **3a**, losses were observed to exclusively occur from the amino acid residue. In the fragmentation behaviour of ions **2a** and **3a**, losses from the amino acid residue were usually acetyl (42 Da) and acetyl + $\text{NH}_3 + \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$ (105 Da). These losses were also observed, in a previous study,²¹ in the fragmentation experiments of some similar ions structures, identified in the reactions of the same blocked amino acid here studied (acetyl-arginine), with aldehydic (glyoxal, methylglyoxal and phenylglyoxal) and diketonic (diacetyl) α -dicarbonyls. They were also observed in the fragmentation of protonated acetyl-arginine molecules. In addition, the two mentioned losses, of 42 and 105 Da, were even observed in the fragmentation of protonated triosidines molecules,²⁸ since these compounds included acetyl-lysine residues in their ion structures, which fragment quite similarly to the acetyl-arginine ones.²¹ With respect to the fragmentation behaviour of class **a** ions, it can be deduced that more stabilized reaction moieties in the arginyl group appear to be developed in ions **3a** and ions **2a**, than in ions **1a** structures. This, together with the fact that ions **1a**, **2a** and **3a** differ from 18 Da, justifies that ions **2a** and **3a** are single and

double dehydrated forms of ions **1a**, respectively, being thus class **a** ions, structurally related. Therefore, the structures of protonated molecules of acetyl-dihydroxyimidazolidines, acetyl-hydroimidazolones and acetyl-dihydroxyimidazolidines – H₂O were attributed to ions **1a**, **2a** and **3a**, respectively (Table 2).

Ions of class **b** (Table 1), ions **1b** and **2b**, in particular, were observed for all reactions systems studied, although ions **3b** were only observed in the 1-phenyl-1,2-propanedione system (Table 1). Similarly to class **a** ions, ions **1b**, **2b** and **3b**, in the ESI mass spectra, differ by 18 Da. In the MS-MS experiments performed, ions **1b** and **2b** revealed losses mostly from reaction moieties, formed in the arginyl group of the reacted acetyl-arginine structure. These losses included one and two water molecules and two dicarbonyl molecules (ions **1b** fragmentation), and one water and one dicarbonyl molecules (ions **2b** fragmentation), as the most prominent ones observed. Conversely, in ion **3b** fragmentation, losses from the amino acid residue occurred exclusively, such as one water molecule, acetyl (42 Da) and acetyl + NH₃ + CO + H₂O (105 Da). This may suggest that the reaction moiety formed in the arginyl group, in ion **3b** structure, is considerably more stable than the moieties formed in the same amino group, in ions **1b** and **2b** structures. Since the losses of one dicarbonyl and two dicarbonyl molecules were noted in ions **1a** and **2b** fragmentations, respectively, it is possible that two connected imidazolidine rings are developed in ions **1a** structures. In ions **2b** structures, one of the imidazolidine rings might be an imidazolone ring. In ion **3b** structure, two connected imidazolone rings must be formed. The formation of doubly connected imidazolidine rings in the arginyl group, must involve the reactivity of the most nucleophilic *N* atom of the arginyl group (*N*₈), such as when acetyl-dihydroxyimidazolidine structures are made to react with another dicarbonyl molecule.

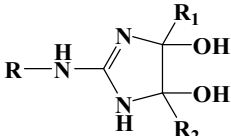
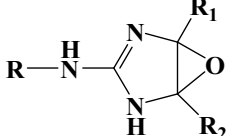
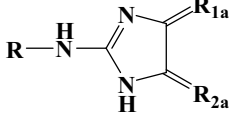
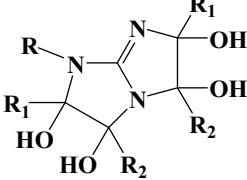
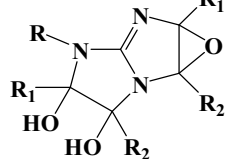
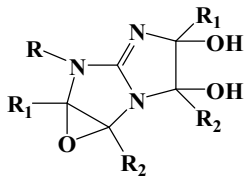
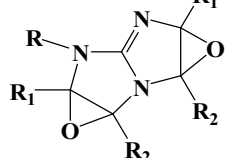
Accordingly to literature, involvement of N_δ atom occurs in the formation of hydroimidazolone-methylglyoxal isomers (MG-H2 and MG-H3).^{16,19} The reaction moiety formed at the arginyl group, in ion **3b** structure, is more stable than the moieties developed in the same amino group, in ions **1b** and **2b** structures. This observation, together with the fact that ions **1b**, **2b** and **3b** differ by 18 Da, led us to suggest that ion **3b** structure is the most dehydrated species in class **b** ions, and that all ions from this class are structurally related. Therefore, the structures of protonated molecules of acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines), acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H_2O and acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – $2H_2O$ were attributed to ions **1a**, **2a** and **3a**, respectively (Table 2).

It is important to refer that, in the fragmentation of ions **2b**, two different fragmentation patterns appear to result, concerning the two more symmetrical (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione) and the two more asymmetrical (1-phenyl-1,2-propanedione and 2,3-hexanedione) dicarbonyl systems. For more symmetrical dicarbonyls, the fragmentation patterns mentioned include losses of one and two water molecules, being the former the most prominent, together with the relevant loss of one dicarbonyl molecule. For the more asymmetrical dicarbonyls, the loss of one water molecule was almost negligible, instead. Furthermore, knowing that ions **2b** structures include one imidazolidine and one imidazolone ring, the release of water molecules, in ions **2b** fragmentation, can only be rationalized in terms of the fragmentation of the connected imidazolidine ring at ions **2b** structures, since imidazolidine rings are less stable than imidazolone ones, upon fragmentation. Concerning the referred losses, in the fragmentation of ions **2b**, it can be rationalized that the dicarbonyl molecule loss (more asymmetrical dicarbonyls) should occur from an imidazolidine ring located near the amino acid residue, since in this case the imidazolidine suffers more from

steric/energetic influences of the amino acid residue. Conversely, losses of one and two water molecules (more symmetrical dicarbonyls) should occur from an imidazolidine most distant from the amino acid residue, which is consistent with the fragmentation behaviour of regular imidazolidine rings, such as in ions **1a** structures, where amino acid residue influences are absent. These assumptions seem to provide a reasonable explanation for the two different fragmentation patterns determined for ions **2b**. Nevertheless, one must be aware that in order to understand the formation of different compound structures, for the two more symmetrical and the two more asymmetrical dicarbonyl systems, energetic and steric influences of both amino acid residue and imidazolidine ring formed, nearest the residue, in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) structures, should be considered, in terms of condensed phase chemistry.

Furthermore, in the ESI mass spectra, of alkyl-dicarbonyls (2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) systems, in particular, several other ions were also identified (not shown). These ions possess characteristic ion structures also but, for clarity, the discussion of their formation is not approached in this report.

Table 2. Proposed ion structures for the ions of interest, identified in the ESI mass spectra; ions **1a-3b**.

Ions of interest	Ion structures ^a
acetyl-dihydroxyimidazolidine (ions 1a)	 (A, B, C and D)
acetyl-hydroimidazolone (ions 2a)	 (A, B, C and D)
acetyl-dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O (ions 3a)	 (A, B, C and D)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) (ions 1b)	 (A, B and C)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – H ₂ O (ions 2b)	 (A and C)
	 (B and D)
acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H ₂ O (ions 3b)	 (A)

^a The ion structures proposed refer to singly protonated molecules, $[M + H]^+$.

R = CH(COOH)(NHCOCH₃)(CH₂)₃.

R₁ = CH₃ (1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione) and CH₂CH₃ (3,4-hexanedione). R_{1a} = R₁ – H.

R₂ = CH₂CH₃ (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione), CH₂CH₂CH₃ (3,4-hexanedione) and phenyl (1-phenyl-1,2-propanedione). R_{2a} = R₂ – H.

A, B, C and D stand for 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione reaction systems, respectively.

Considerations regarding the reaction products formed and reaction mechanistics.

Theoretically, all reactions of arginine with α -dicarbonyls proceed via dihemiaminal (dihydroxyimidazolidines).¹⁸ The dihemiaminal (double hemiaminal), in dihydroxyimidazolidines structures, is not very stable with respect to water elimination, which normally occurs spontaneously in amine-carbonyl reactions. Indeed, the stability of hemiaminals decreases with the presence of electron donor substituents, although it increases with increasing electronegativity of the substituents.^{18,29} In the present report, acetyl-dihydroxyimidazolidines (compounds **1a**) were detected in the early beginning of the reactions, such as five minutes to one day (Table 1). In the present study also, acetyl-dihydroxyimidazolidines, with less stable hemiaminals (presence of alkyl substituents), were proposed to eliminate one and two consecutive water molecules, leading to the formation of acetyl-hydroimidazolones and acetyl-dihydroxyimidazolidines – 2H₂O, respectively. This assumption is coherent with literature results, regarding the elimination of one water molecule from dihydroxyimidazolidines, and the formation of hydroimidazolones, for the reactions of aldehydic dicarbonyls, in particular.^{16,17,19}

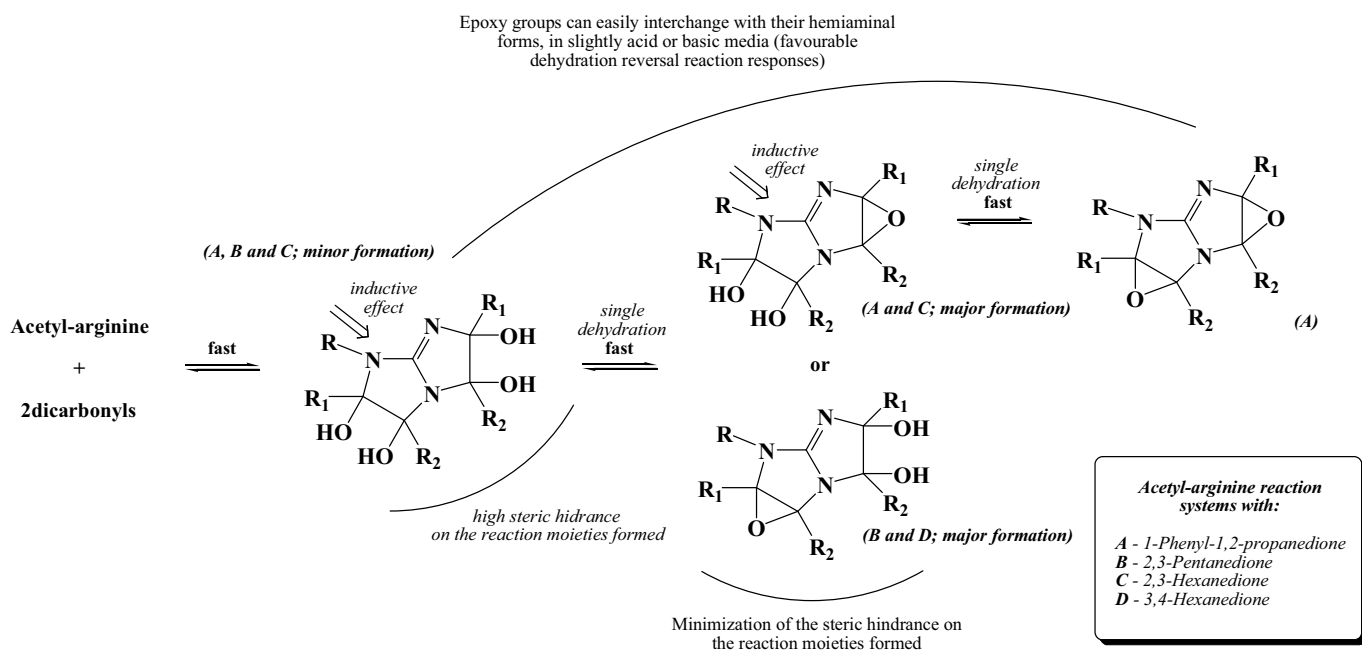
Accounting that dihemiaminals (dihydroxyimidazolidines) are formed in the reaction of arginine with α -dicarbonyls, and that *N* atoms of arginyl guanidino group possess similar nucleophilic strength, it can be assumed that energetic equivalence/difference of the developed dihemiaminal electrophiles, are quite similar to the reacted dicarbonyl molecules ones. In the literature, it has been observed that when dicarbonyl molecules (glyoxal and 1,2-cyclohexanedione) having electrophiles with equivalent energetics, reacts with arginine, the formation of stable dihemiaminals occurs.¹⁸ Conversely, for the remaining reacted dicarbonyl molecules, having electrophiles with different energetics, the formation of less stable dihemiaminals

results, favouring their subsequently dehydration with hydroimidazolones formation.¹⁸ This means that single dehydration of dihemiaminals is a reaction process more specific of asymmetrical dicarbonyls reactivity, in particular. Furthermore, single dehydrated acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines), identified in all reactions systems, and possessing two connected imidazolidines rings in their molecular structures, were detected after five minutes of reaction (Table 1) and also through a long reaction time period (i.e. more than two weeks), in comparison to the remaining compounds identified. In the formation of acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, the importance of single dehydration reaction process is reinforced in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) chemistry, in comparison to acetyl-dihydroxyimidazolidines chemistry, and in both compounds the formation and reactivity of dihemiaminals is involved. This behaviour, together with the fact that two compound structures were determined for the former mentioned species, with respect to the two more symmetrical and the two more asymmetrical dicarbonyl systems, led us to propose a reaction mechanism for the reaction of acetyl-arginine with selected diketonic dicarbonyls (Scheme 1), on basis of the recognized dihemiaminals chemistry. We therefore concluded that the major importance of single dehydration in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) chemistry relies on the reaction moieties high steric hindrance developed in the reacted arginyl group, in which single dehydration, by being a fast reaction process, can favourably contribute to minimize reaction moieties steric hindrance. The importance of single dehydration in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) chemistry, is sustained within our gas phase results, since protonated single dehydrated acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) molecules possess higher relative abundances, in the ESI mass spectra, for the two more asymmetrical dicarbonyls (1-phenyl-1,2-propanedione and 2,3-hexanedione), in comparison to the two more symmetrical ones (2,3-

pentanedione and 3,4-hexanedione) (Table 1). This behaviour agrees with the fact that single dehydration is a reaction process specific of more asymmetrical dicarbonyls reactivity, as mentioned in acetyl-dihydroxyimidazolidines chemistry. Moreover, we have taken into consideration acetyl-arginine residue steric/energetic influences, in the structure of the nearest imidazolidine located, at acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) structures, as an attempt to explain the two compound structures proposed for single dehydrated acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines). Therefore, dihemiaminal electrophiles, possessing originally equivalent energetics, when they result from the reaction of more symmetrical dicarbonyls, in the structure of the nearest located imidazolidine ring, and under the influence of the amino acid residue, may possess more different energetics. This is due to the electron donor character of the amino acid residue, on the dihemiaminal electrophiles energetics in the nearest imidazolidine ring located. This may also favourably contribute to the occurrence of single dehydration on the referred imidazolidine ring, in comparison to the other imidazolidine ring located most distant from the amino acid residue, in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) structures. For dihemiaminal electrophiles having more different energetics, when they result from the reaction of more asymmetrical dicarbonyls, and under the influence of the amino acid residue, they may suffer from a reduction of the electrophiles energetics difference. Thus, single dehydration occurs from the imidazolidine located most distant from the amino acid residue. Although the amino acid residue reduces the electrophiles energetic difference, that shall not be much significant for 1-phenyl-1,2-propanedione, since this dicarbonyl molecule has electrophiles with very much different energetics. This is also the reason why, in comparison to the remaining dicarbonyl systems, single dehydrated acetyl-bis(dihydroxyimidazolidine), for 1-phenyl-1,2-propanedione, suffer a subsequent dehydration, with the formation of two connected imidazolone rings. Depending on the

nature of the reacted dicarbonyl molecules, single dehydration appears to also, selectively, minimize the steric hindrance between the reaction moieties formed and the amino acid residue (Scheme 1).

The bicyclic ring structure formation, in singly dehydrated bis(dihydroxyimidazolidines), appears to be controlled by a unique reaction process (single dehydration), and epoxy groups can easily be converted into dihemiaminal forms in slightly acidic or basic media. This could account for the reversible nature of the modification of arginine residues by diketonic dicarbonyls. This could also be quite useful regarding that single dehydrated bis(dihydroxyimidazolidines) are the most relevant reaction products identified in the reactions of acetyl-arginine with the selected diketonic dicarbonyls.



Scheme 1. Proposed reaction mechanism for the reaction of one acetyl-arginine molecule with two diketonic dicarbonyl molecules. R, R₁, R_{1a}, R₂ and R_{2a} as in Table 2.

CONCLUSIONS

Ions, grouped in two classes, were identified in the reactions of acetyl-arginine with selected diketonic α -dicarbonyls namely, protonated acetyl-dihydroxyimidazolidines and acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) molecules, and corresponding dehydrated species, by means of ESI mass spectrometry experiments. Dihydroxyimidazolidines, and their dehydrated form, hydroimidazolone, are known to be formed in solution, from the reaction of the same blocked amino acid here used, with aldehydic dicarbonyls.^{17–19} Gas phase data revealed that, in the fragmentation of precursor ions differing by 18 Da, the most dehydrated ion species fragmented mostly on the acetyl-arginine residue, in comparison to the less or no dehydrated ion species, which fragmented mostly on the arginyl guanidino group reaction moieties formed. This observation justifies the formation of more stable reaction moieties in the arginyl guanidino group, for the more dehydrated ion species identified.

Acetyl-dihydroxyimidazolidines and acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) were both proposed to single and double dehydrate. Acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, in particular, were detected through a long reaction time period, in comparison to the other compounds identified. The reinforced importance of single dehydration in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) chemistry, in comparison to acetyl-dihydroxyimidazolidines chemistry, and considering that in either compounds their reactivities involve dihemiaminal chemistry,¹⁸ stimulated us to approach the reaction mechanism involved in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) formation. The fact that two different compound structures were attributed to acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, in what the two more symmetrical and the two more asymmetrical dicarbonyls studied are concerned also contributed to this investigation. Concerning acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) formation, we concluded

that the enhanced importance of single dehydration relies on the rapid minimization of the high steric hindrance of the reaction moieties formed. The two different compounds structures attributed to acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, were interpreted on basis of acetyl-arginine residue energetic/steric influences on the nearest imidazolidine ring located, at acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) structures. To this respect, we concluded that the occurrence of single dehydration is also responsible for selectively minimization of the steric hindrance provided by the amino acid residue and by the reaction moieties formed. In addition, since single dehydration appears to control the formation of acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) – H₂O, the reversal reaction could easily occur, since epoxy groups can easily be converted into their dihemiaminal forms, in slightly acidic or basic media. We believe that the type of reaction moieties formed, in acetyl-bis(dihydroxyimidazolidines) class compounds, along with its mechanistics, might be used to better understand the reversible nature of chemical modifications occurring in arginine residues, promoted by diketonic dicarbonyls. These findings suggest that a very specific arginine modification arises, which may also contribute to the development of new strategies for controlling and inhibiting glycation processes involving arginine residues.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Doctor Carlos Cordeiro and Professor Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their inestimable contribution to this work. Discussions with Professor Susana Santos (CQB-FCUL, Portugal) are also acknowledged. One of the authors, M. A. Saraiva, thanks FCT (Portugal) for financial support (SFRH/BD/3162/2000).

REFERENCES

1. Grossberg AL, Pressman D. *Biochemistry*. 1968; **7**: 272.
2. Yankeelov JA Jr. *Biochemistry*. 1970; **9**: 2433.
3. Yankeelov JA Jr. *Methods Enzymol*. 1972; **25**: 566.
4. Patthy L, Thész J. *Eur. J. Biochem*. 1980; **105**: 387.
5. Riordan JF. *Biochemistry*. 1973; **12**: 3915.
6. Werber MM, Moldovan M, Sokolovsky M. *Eur. J. Biochem*. 1975; **53**: 207.
7. Miller AG, Meade SJ, Gerrard JA. *Bioorg. Med. Chem*. 2003; **11**: 843.
8. Monnier VM, Cerami A. *Science*. 1981; **211**: 491.
9. Njoroge FG, Monnier VM, in *The Maillard reaction and aging, diabetes and nutrition.*, Baynes JW, Monnier VM (Eds.), Alan R. Liss, New York, 1989, pp. 85–109.
10. Brownlee M. *Nature*. 2001; **414**: 813.
11. Brownlee M. *Diabetes*. 2005; **54**: 1615.
12. Vitek MP, Bhattacharya K, Glendening JM, Stopa E, Vlassara H, Bucala R, Manogue K, Cerami A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; **91**: 4766.
13. Smith MA, Tanida S, Richey P, Miyata S, Yan SD, Stein D, Sayre LM, Monnier VM, Perry G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994; **91**: 5710.
14. Vlassara H, Bucala R, Striker L. *Lab. Invest*. 1994; **70**: 138.
15. Maillard L-C. *C. R. Hebd Seances Acad. Sci. Ser*. 1912; **154**: 66.
16. Ahmed N, Thornalley PJ. *Biochem. J*. 2002; **264**: 15.
17. Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem*. 1994; **269**: 32299.
18. Glomb M, Lang G. *J. Agric. Food Chem*. 2001; **49**: 1493.

19. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
20. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 216.
21. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 755.
22. Eberlin MN. *Eur. J. Mass Spectrom.* 2007; **13**: 19.
23. Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **246**: 84. (and references therein).
24. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2007. (submitted)
25. Kebarle P, Tang L. *Anal. Chem.* 1993; **65**: 972A.
26. Bruins AP, in *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RD (Ed.), John Wiley & Sons, New York, 1997 (chap. 3).
27. Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1999; **10**: 625.
28. Tessier FJ, Monnier VM, Sayre LM, Kornfield JA. *Biochem. J.* 2003; **369**: 705.
29. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 1346.

7.2.2. Conclusões.

Por aplicação de técnicas de espectrometria de massa ESI, identificaram-se produtos de reacção, para a reacção da acetil-arginina com os α -dicarbonilos dicetónicos seleccionados, cujas estruturas determinadas se incluem em duas classes de compostos, os compostos de acetil-dihidroxiimidazolidina e de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), e correspondentes formas desidratadas, a uma e a duas moléculas de água. Estas duas classes de compostos foram também identificadas na reacção da acetil-arginina com o dicarbonilo diacetil, como se referiu no estudo apresentado anteriormente, neste capítulo. É de notar que os resultados obtidos para este último sistema reaccional, e correspondentes observações, foram utilizados no presente estudo. Em conformidade com o estudo anterior, apresentado neste capítulo, nas experiências MS-MS realizadas, no presente estudo, a fragmentação dos iões precursores identificados ocorrera ao nível dos agregados formados no grupo arginil do aminoácido modificado acetil-arginina, ao passo que nas formas dos iões precursores desidratadas a fragmentação resultara sobretudo ao nível do resíduo de acetil-arginina, com maior incidência no caso da fragmentação de iões precursores duplamente desidratados. Relativamente às classes de compostos mencionadas, existe evidência na literatura para a formação em solução de compostos de dihidroxiimidazolidina, e de formas desidratadas, em particular da forma de hidroimidazolona, para reacção do mesmo aminoácido modificado com alguns dos dicarbonilos estudados no presente trabalho, i.e. glioxal e metilglioxal [21–23]. Um aspecto curioso neste estudo prende-se com a formação das espécies pertencentes à classe de compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) e de correspondentes formas desidratadas. Deste modo, observou-se a detecção da forma mono-desidratada do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) para um tempo de reacção bastante longo (i.e. superior a duas semanas), para além do facto da molécula protonada do composto desidratado referido apresentar uma abundância relativa bastante elevada, constituindo o ião mais abundante observado, no espectro de massa ESI, para a maioria dos sistemas de reacção estudados, e também em função do tempo de reacção monitorizado. Além disso, foram propostas estruturas distintas para os compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) mono-desidratados, no que respeita aos sistemas de reacção dos dicarbonilos mais simétricos (2,3-pentanodiona e 3,4-hexanodiona) e mais assimétricos (1-fenil-1,2-propanodiona e 2,3-hexanodiona). O facto do processo de desidratação a uma molécula de água ser mais importante na reactividade de acetil-bis(dihidroxiimidazolidinas) do que na reactividade de compostos estruturalmente

semelhantes, como as acetil-dihidroxiimidazolidinas, e o facto de ambos os compostos envolverem química dihemiaminal, levou-nos a optar por uma investigação pormenorizada do mecanismo reaccional envolvido, para a formação dos compostos pertencentes à classe de compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), e também dos compostos incluídos na classe acetil-dihidroxiimidazolidina. É de notar que na reactividade da forma dihemiaminal, na estrutura de acetil-dihidroxiimidazolidina, o processo de desidratação a uma molécula de água parece ser específico de formas dihemiaminal contendo centros electrofílicos com energética diferente, estando estas, por conseguinte, relacionadas com a reactividade de compostos de dicarbonilo com centros electrofílicos, também com energéticas diferentes. Tendo em consideração o facto do agregado formado, ao nível do grupo arginil, no composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), apresentar um grande impedimento estereoquímico, dada a formação de dois anéis de imidazolidina no referido grupo arginil, a desidratação a uma molécula de água pode constituir um processo de reacção compensador, para a minimização do impedimento estereoquímico desenvolvido no agregado de anéis de imidazolidina formado. Tal sucede na medida em que o processo de desidratação a uma molécula de água constitui um processo de reacção relativamente rápido, e seguramente mais rápido que o processo de desidratação a duas moléculas de água. Com base neste pressuposto é possível interpretar a formação significativa observada para a forma mono-desidratada do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), a partir da reconhecida reactividade do composto estruturalmente relacionado de acetil-dihidroxiimidazolidina. Face às duas propostas estruturais para os compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) mono-hidratados, para os sistemas reaccionais dos dicarbonilos mais simétricos e mais assimétricos, concluiu-se que, apesar do processo de desidratação a uma molécula de água ser um processo importante para a minimização dos efeitos estereoquímicos nos agregados formados ao nível do grupo arginil da acetil-arginina reagida, ele também pode ser usado de forma selectiva, para a compensação dos efeitos estéricos e energéticos proporcionados pelo resíduo na estrutura do aminoácido modificado acetil-arginina. Esta observação mecanística teve na sua base interpretativa a influência dos efeitos estéricos e energéticos do resíduo da acetil-arginina e do anel de imidazolidina mais adjacente, ao referido resíduo do aminoácido modificado. Assim, considerando que, aparentemente, o processo de desidratação a uma molécula de água é o único processo responsável pela minimização do impedimento estereoquímico do agregado formado no grupo arginil, no composto

mono-desidratado de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), podendo ainda este ter um papel selectivo na minimização ocorrida, e que o processo de desidratação ocorrido é completamente reversível, em meio ligeiramente ácido ou básico, é possível, deste modo, interpretar a reversibilidade da modificação dos resíduos de arginina pelos compostos de α -dicarbonilo dicetónicos. No contexto da glicação, em especial no que respeita ao controlo e à inibição dos processos de glicação, estas observações podem ter uma importância de relevo, na medida em que na formação dos compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) se tem a minimização dos efeitos estereoquímicos nos agregados formados, que pode ainda ocorrer de uma forma selectiva, sendo controlados por um único processo de reacção, a desidratação a uma molécula de água, que constitui um processo completamente reversível, e conhecido no âmbito da reactividade química.

Na base da metodologia adoptada neste estudo foi possível interpretar um tipo de modificações químicas, por recurso ao estudo de reacções de acetil-arginina com α -dicarbonilos, por ESI-MS, e atendendo à informação mecanística disponível na literatura. De notar a importância da metodologia desenvolvida para assistência e complementação da informação do comportamento de solução para os sistemas reaccionais em causa. Além disso, as modificações químicas estudadas ao nível da arginina podem perfeitamente ter a sua validade na interpretação de modificações ocorridas à escala das grandes moléculas, como as proteínas.

É de referir que neste estudo apenas foi descrita a reactividade da acetil-arginina na investigação das classes de compostos de acetil-dihidroxiimidazolidinas e de acetil-bis(dihidroxiimidazolidinas). Na verdade, foram ainda identificados outros tipos de compostos mais condensados (Anexo), e, como tal, de natureza mais complexa, e que são abordados no capítulo seguinte, conjuntamente com a análise realizada para as reacções da guanidina com α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos.

7.2.3. Bibliografia.

- [1] Yankleelov JA Jr, Kochert M, Page J, Westphal A. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1966; **25**: 590.
- [2] Yankeelov JA Jr, Mitchell CD, Crawford TH. *J. Am. Chem. Soc.* 1968; **90**: 1664.
- [3] Grossberg AL, Pressman D. *Biochemistry.* 1968; **7**: 272.
- [4] Vallee BL, Riordan JF, Bethune JL, Coombs TL, Auld DS, Sokolovsky M. *Biochemistry.* 1968; **7**: 3647.

- [5] Riordan JF. *Fed. Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 1970; **29**: 462.
- [6] Patthy L, Thész J. *Eur. J. Biochem.* 1980; **105**: 387.
- [7] Patthy L, Smith EL. *J. Biol. Chem.* 1975; **250**: 565.
- [8] Riordan JF, McElvany KD, Borders CL Jr. *Science. (Washington DC)* 1977; **195**: 884.
- [9] Borders CL Jr, Riordan JF. *Biochemistry.* 1975; **14**: 4699.
- [10] Kantrowitz ER, Lipscomb WN. *J. Biol. Chem.* 1976; **251**: 2688.
- [11] Patthy L. *Eur. J. Biochem.* 1978; **88**: 191.
- [12] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4451.
- [13] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4671.
- [14] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 675.
- [15] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1984; **277**: 379.
- [16] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov MV, Nikolaev VI, Shkurov VA. *Zh. Anal. Khim.* 1985; **40**: 1272.
- [17] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1193A.
- [18] Warwood S, Mohammed S, Cristea IM, Evans C, Whetton AD, Gaskell SJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; **20**: 3245.
- [19] Yankeelov JA Jr. *Methods Enzymol.* 1972; **25**: 566.
- [20] Miller AG, Meade SJ, Gerrard JA. *Bioorg. Med. Chem.* 2003; **11**: 843.
- [21] Glomb M, Lang G. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493.
- [22] Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
- [23] Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.

8. Reacções da guanidina com α -dicarbonilos.

Nos estudos apresentados nos capítulos anteriores, foram caracterizadas as reacções dos aminoácidos modificados acetil-lisina e acetil-arginina com compostos α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos. No estudo de que se ocupa o presente capítulo, irá abordar-se a reacção da guanidina com o mesmo conjunto de compostos α -dicarbonilo, salvo a excepção do dicarbonilo fenilglioxal, dada a inviabilidade da reacção nas condições reaccionais estudadas. Nas reacções da acetil-arginina, em particular, observou-se a importância da contribuição do resíduo do aminoácido modificado ao nível da estabilidade dos agregados formados, no grupo arginil. Assim, na tentativa de elucidação desta influência, e na possível investigação do comportamento do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina, optou-se também por estudar o grupo arginil de forma isolada, i.e. na forma do composto guanidina. Como as modificações químicas ocorridas no aminoácido modificado acetil-arginina se processam exclusivamente ao nível do grupo arginil [1–4], o estudo da reactividade da guanidina pode, de facto, fornecer uma informação complementar para a formação dos produtos da reacção identificados, na reacção da acetil-arginina com os α -dicarbonilos seleccionados. Além disso, como nas reacções da guanidina é esperada a formação do mesmo tipo de compostos, é possível reunir uma informação mais precisa e definitiva para os agregados formados ao nível do grupo arginil da acetil-arginina, no que respeita aos aspectos estruturais dos produtos de reacção formados, e na base das experiências MS-MS realizadas. Também, uma maior profundidade de informação, ao nível da fragmentação das moléculas protonadas dos produtos de reacção identificados nas reacções da guanidina, pode inclusivé fornecer uma informação mais concreta sobre a estabilidade e natureza estrutural dos produtos de reacção envolvidos.

8.1. Objectivos.

No presente trabalho é estudada a reacção da guanidina com os compostos de α -dicarbonilo aldeídicos (glioxal e metilglioxal) e dicetónicos (diacetil, 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona), por aplicação de técnicas de espectrometria de massa de electrospray. Sumariamente, neste estudo pretende-se (i) identificar e caracterizar iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, para os sistemas reaccionais da guanidina, (ii) comparar as estruturas iónicas propostas para as reacções da guanidina, com base na análise ESI-MS, com as estruturas

anteriormente estabelecidas para a reacção da acetil-arginina, (iii) utilizar alguma informação espectral, no que respeita às abundâncias iónicas dos iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, para as misturas reaccionais em causa, em particular para os iões de interesse mais estruturalmente semelhantes, e com razões massa/carga mais próximas, (iv) reunir um conjunto de informação sobre os aspectos estruturais dos produtos de reacção identificados, bem como dos aspectos relativos ao comportamento cinético e mecanístico das reacções da guanidina com o conjunto de α -dicarbonilos seleccionados, (v) comparar as propostas mecanísticas estabelecidas para as reacções da guanidina e da acetil-arginina, (vi) utilizar o conjunto de informação obtido para a interpretação dos processos de glicação, em especial para os processos de glicação que incluam a reactividade dos resíduos de arginina, nas proteínas.

Towards the control and inhibition of glycation – the role of the guanidine reaction center with aldehydic and diketonic dicarbonyls. A mass spectrometry study

Marco A. Saraiva,^{1,2} Carlos M. Borges^{1,2} and M. Helena Florêncio^{1,2*}

¹ Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

² Center for Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal

Received 4 April 2006; Accepted 3 August 2006

Glycation of proteins by glucose and formation of end-stage adducts (AGEs, advanced glycation end products) has been implicated in pathological mechanisms associated with diabetic complications, macrovascular disease, chronic and renal insufficiency, Alzheimer's disease, and aging. Of the carbonyl containing compounds involved in this process, α -dicarbonyls have particular importance, being established as direct intermediates in the formation of well-known AGEs. The guanidino group, present in arginine residues, suffers direct modifications by sugars and its derivatives, and is considered to be an important chemical basis, targeting the control and inhibition of glycation.

Seven dicarbonyl compounds, aldehydic and diketonic, were reacted with guanidine, in an attempt to establish structure/activity relationships. Electrospray mass spectrometry, together with *tandem* mass spectrometry, was used to identify and characterize the reaction products. The reactivity of guanidine was found to vary with the dicarbonyls used. For glyoxal, a high amount of dihydroxyimidazolidine was formed, whereas for methylglyoxal, dihydroxyimidazolidine was slowly converted into hydroimidazolone. Interestingly, aqueous guanidine was found to prevent argpyrimidine formation. The formation of several amine-dicarbonyl moieties was observed for the larger alkyl-diketonic dicarbonyls reaction systems, in particular. Molecular structures, bearing a polar chain, of an imidazole ring, and a nonpolar one, of alkyl groups, located at both sides of the imidazole rings, were attributed to these moieties. Gas-phase experiments suggested that the larger alkyl groups have a preference for being located at one of the sides of the imidazole rings. Moreover, the referred amine-dicarbonyl moieties are formed via (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. The latter (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties are formed in high amounts in the larger alkyl-diketonic dicarbonyl reactions. Since these moieties react with dicarbonyl molecules, and react even faster with already modified amine functions, we can foresee that these species may be useful for controlling and inhibiting glycation of larger biomolecules, such as proteins. Copyright © 2006 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: glycation; electrospray mass spectrometry; α -dicarbonyls; guanidine; advanced glycation end products

INTRODUCTION

Glycation is described as the reaction of reducing sugars with basic amino groups of proteins and nucleic acids, as well as simple amines, without enzyme mediation. This type of reactions, especially the ones related with free amino acids, were first studied by the French chemist Louis Maillard in the beginning of the twentieth century. However, it was in the food chemistry area that the Maillard reaction made its contribution.¹ With the continuous increase in sensitivity and selectivity of advanced analytical techniques, such as gas chromatography, high-performance liquid chromatography,

and mass spectrometry, assessment of the Maillard reaction *in vivo* became possible. Under physiological conditions, glycation can be detected in the process of aging. Nevertheless, these reactions are considered to be faster and more intensive under pathophysiologic conditions, and are associated with persistently high concentration of blood glucose, i.e. hyperglycemia.² This chronically high blood glucose, due to hyperglycemia conditions, causes reversible alterations in cellular metabolism, with cumulative and irreversible changes in tissue protein. Therefore, glycation has often been related to chronic complications of diabetes mellitus, renal failure, degenerative changes occurring in the course of aging, and also to some neurologic diseases.³ Chemically, the Maillard reaction is very complex and multilevel, and can be described in three stages. Briefly, in the first stage, the reaction is initiated with the reversible formation of a Schiff's base, an unstable form between a reducing sugar

*Correspondence to: M. Helena Florêncio, Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Sciences of the University of Lisbon, Campo Grande, C8, 1749-016 Lisbon, Portugal.
E-mail: mhflorencio@fc.ul.pt

and an amino group in proteins. This is followed by a rearrangement, the Schiff's base gives rise to an enamine form, and subsequently to a relatively stable ketoamine compound (Amadori product). In the intermediate stage, both Schiff's base and Amadori products further undergo a series of reactions through dicarbonyl intermediates, the latter being more reactive than the starting dicarbonyl molecules. Finally, in the last stage, chemically irreversible as the preceding one, a wide variety of heterogeneous structures, commonly termed *advanced glycation end products* (AGEs), are formed. Generally, AGEs are characterized by a great structural and physicochemical diversity. Furthermore, some AGEs are fluorescent polymers, e.g. pentosidine,⁴ crosslines,^{5,6} and imidazolones,^{7–11} whereas others are neither fluorescent nor have a reticulated structure, e.g. pyrroline¹² and *N*_ε-(carboxymethyl)-lysine.¹³ AGEs can be distinguished with respect to their biological and physiological functions: protein cross-links, recognition factors for specific AGE-binding cell-surface receptors, and markers and risk predictors of disease processes. Protein modification, by formation of AGEs, has also been observed for the changes in structure and function, especially in long-lived structural proteins, such as collagen, fibronectin, tubulin, lens crystallin, myelin, laminin, and actin, in addition to hemoglobin and albumin in LDL-associated lipids and apoprotein.¹⁴ Moreover, recent reports seem to indicate that these adducts, in the course of glycation, inactivate metabolic enzymes.¹⁵ Glyoxal, methylglyoxal, 3-deoxyglucosone, and glucosone (GLO) are the four reactive dicarbonyls that form the group of heterogeneous AGEs.¹⁶ Several lines of evidence also indicate that the increase in reactive carbonyl intermediates is the consequence of hyperglycemia in diabetes. 'Carbonyl stress', followed by oxidative stress and tissue damage, also increases the modification of proteins and lipids.¹⁷ α -Dicarbonyls are an important area to investigate, since they are formed from sugars and lipids.¹⁷

The elucidation of the complex kinetics and chemistry of glycation reactions is essential, not only to better understand the development of important pathologies, such as diabetes, neurodegenerative diseases, and aging, but also to design potentially therapeutic chemical agents that can inhibit and interfere with deleterious glycation reactions. The guanidino group has an important role in glycation processes, not only because it is present in the arginine side chain, but also because it can be used as a chemical basis for pharmacological approach, i.e. to prevent, or slow down, the formation of glycation products. One of the two main pharmacological approaches includes inhibition of the rearrangement of early products into end products, and to prevent the rearrangement of early, still reversible compounds into irreversible and crosslinked end products.^{18–20} The other approach is based on the attempted cleavage of already formed AEGs.^{18–20} Regarding the first approach, the pharmacological agents that are mostly used are substituted guanidines, such as aminoguanidine and metformin, among others.^{18–24} Moreover, AGE cleavage often occurs by using AGE breakers, of which phenacyl thiazole bromide (PTB), which is able to break covalent bonds of crosslinked AGEs, is the most used.^{18–20,25,26} Furthermore,

details about the type of reaction products formed and their stability, along with some structural/activity data, may highlight new strategies for controlling the glycation reactions. Another feature of this study is intended to complement a previous investigation on the reaction of a modified arginine with some dicarbonyls.²⁷ Furthermore, the proton-loving guanidino group is present in a vast number of naturally occurring and synthetic interaction systems that are biologically and pharmacologically relevant.^{28,29} This unit function, composed of a Y-shaped fork with planar geometry, is known to be capable of both directed hydrogen bonding, and nondirected Coulombic interactions with complementary groups.^{28,29} All these factors increased our motivation to study the reactivity of the guanidino group under the reaction conditions that may elucidate the behavior of its reaction center *in vitro* and *in vivo*.

We used mass spectrometry techniques, based on electrospray ionization (ESI) and ion trap mass spectrometry as the methodology, for a detailed investigation of the nonenzymatic reactions of guanidine with two aldehydic [glyoxal, methylglyoxal] and five diketonic dicarbonyls [diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione and 1-phenyl-1,2-propanedione] (Fig. 1). To elucidate the structural aspects of the unknown ions identified in these reactions, ESI was combined with *tandem* mass spectrometry (MS^n ; $n = 2$ and 3).

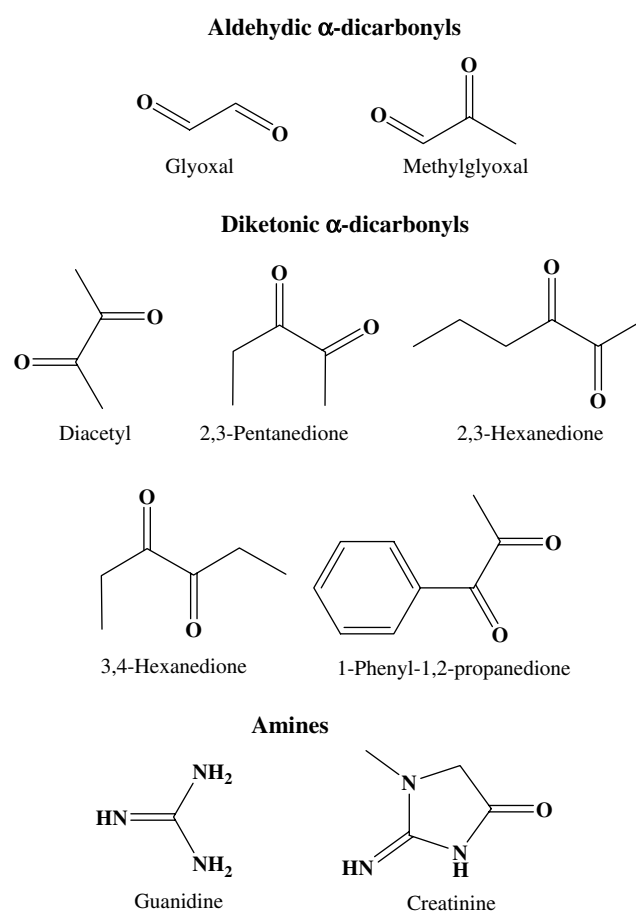


Figure 1. Chemical structures of α -dicarbonyls, guanidine, and creatinine compounds.

EXPERIMENTAL

Materials and methods

Materials

The amino compound guanidine hydrochloride, the dicarbonyls, glyoxal, diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione, and 1-phenyl-1,2-propanedione, the sulfonic buffers HEPES and MOPS, and the methylglyoxal dicarbonyl precursor methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal, were obtained from Sigma. Creatinine and the organic solvent methanol (HPLC p.a.) were from Merck. Ultrapure deionized water (18.2 M Ω .ms), generated in a Milli-Q plus system, was also used in the preparation of the reaction mixtures. Concentrated solutions of sodium hydroxide (NaOH) (solid pellets from Merck) and hydrochloric acid (HCl) (Riedel-de Haën) were employed for adjustment of pH media. All chemicals used were of the highest quality available.

Chemical synthesis of methylglyoxal

In order to avoid some of the main contaminants existing in the commercial methylglyoxal stock solutions that were available, methylglyoxal was synthesized via methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal acid hydrolysis (methylglyoxal yield *ca* 50%, as described in a previous work).³⁰

Preparation and incubation of the reaction mixtures

One milliliter of the buffer solution (200 mM) at pH 7.5, previously prepared, was added to 1 ml of the aqueous solution of the amine compound guanidine (100 mM). To this mixture, 1 ml of the aqueous solution of the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione, and 1-phenyl-1,2-pentanedione (100 mM) were also added separately to make a total volume of 3 ml. After adding the dicarbonyl compounds, the solutions were maintained incubated at 70 °C in a stove (Memmert, model 1500) under air for 28 days. The solutions of the dicarbonyls 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione, and 1-phenyl-1,2-pentanedione were prepared by dissolving them in 60:40 methanol:water (v/v), on account of their lack of solubility in water. Moreover, in order to avoid reversible acetal formation in the methylglyoxal dicarbonyl starting solution, the reaction mixture was initiated at room temperature (r.t.) and then incubated at the desired temperature (70 °C). Time monitoring for the latter reaction system only started after the first 30 min of reaction. Furthermore, aliquots of 100 μ l were taken, at fixed periods of time, and immediately frozen at -80 °C. Experiments were also run with the MOPS buffer, as an alternative to the HEPES buffer, in order to better identify and characterize the ions.

Special care with respect to sample preparation was necessary for the first aliquots that were taken because they were found to be unstable under r.t. conditions.

The reaction in the solution took place immediately after the dicarbonyl compound was added. The pH decreased slightly in the course of the reaction. Thus, the pH data (pH-Meter E516 *titriskop*) were also a good prediction of the reaction's progress. In addition, the pH of all reaction mixtures was adjusted in the first four hours in order to maintain the acceptable range of $6.5 \leq \text{pH} \leq 7.5$,³¹ i.e. a difference of one pH unit.

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis

The mass spectra were obtained on a Finnigan LCQ Duo ion trap mass spectrometer, equipped with an electrospray ionization (ESI) source, and maintained at a voltage of 4.5 kV. The flow-rates of coaxial sheath and auxiliary gases (both nitrogen) were *ca* 20 psi. Furthermore, the capillary was kept at a voltage of *ca* 10 V and maintained at 220 °C. The pressure, measured with the convectron gauge during electrospray experiments, was normally 0.92 Torr. The base pressure in the ion trap filled with helium was *ca* 1.12×10^{-5} Torr. The mass spectra recorded were obtained after diluting the stored samples 200 times in ultrapure water. Samples were introduced directly in the ESI source at a flow-rate of 5 μ l/min. Positive ion mode was selected for the experiments, and the mass range was m/z 50–1000. The mass spectrometer was operated using three microscans, with a maximum ion injection time of 50 ms (default values), and the recorded mass spectra were based on 1 min acquisition.

In the MS² experiments, the selected precursor ions were isolated in the ion trap and forced to collide with helium gas. Therefore, for collision energy of ionic species excitation, 20–50% of the maximum available collision energy was applied. This energy magnitude was chosen in order to ensure that the precursor ions could be observed in the ESI-MS² spectra, i.e. with a remaining peak intensity of about 1–5% for precursor ions. The total ion current was above 5×10^3 in all cases. MS³ experiments were also carried out, especially for the precursor ions with higher molecular weights.

Mass spectrometric data were obtained by using the supporting software Xcallibur version.

Reaction systems, and ESI-MS analysis, were performed in duplicate. ESI-MSⁿ spectra were repeated two to three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Behavior of the dicarbonyl reaction systems under ESI mass spectrometry conditions

The ESI mass spectra of aliquots of the reaction solutions of guanidine with the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione dicarbonyls, revealed little or no fragmentation. These mass spectra exhibit mostly $[M + H]^+$ ions, as shown in Fig. 2, for glyoxal, methylglyoxal and 2,3-hexanedione dicarbonyls. $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ m/z values and corresponding ion abundances of the compounds identified are presented in Tables 1 and 2, for the reaction systems studied. The relative ion abundances were normalized to m/z 261 buffer ions and determined at two different reaction times.

For the diketonic dicarbonyl reaction systems, more diversity of ions was observed in the ESI mass spectra, in comparison with the other dicarbonyl reaction systems. It should be noted that, in the seven dicarbonyl reaction systems studied, the ion current of the m/z 261 buffer ions in the ESI mass spectra did not change significantly with reaction time. For this reason, this ion was used as the internal standard. Besides, according to ESI analysis, the

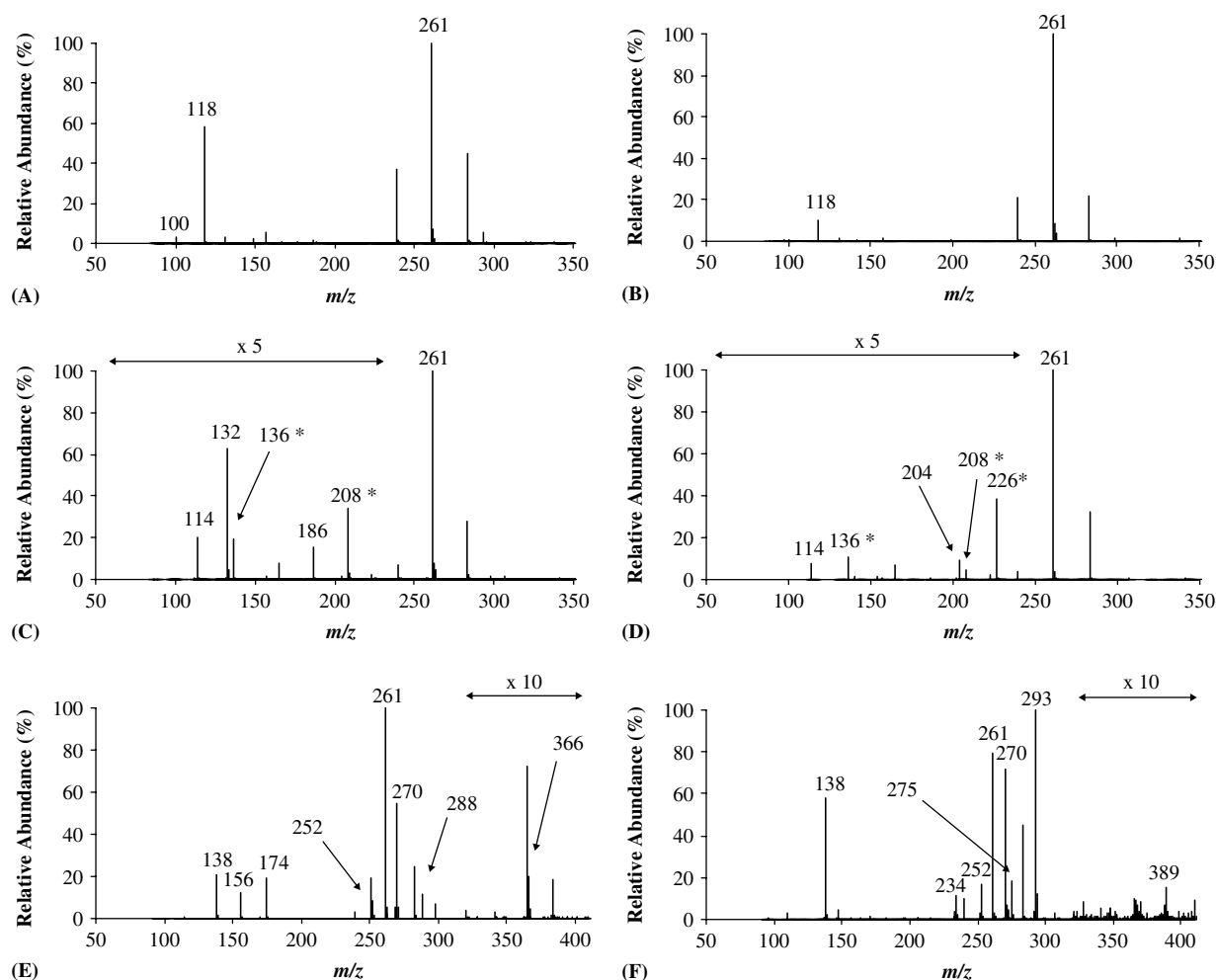


Figure 2. ESI mass spectra of aliquots of glyoxal (A) and (B), methylglyoxal (C) and (D), and 2,3-hexanedione (E) and (F) reaction systems solutions. (A), (C) and (E): 30 min. (B), (D) and (F): 1 day. The peaks for which the m/z values are indicated correspond to $[M + H]^+$ or to $[M + Na]^+$ adduct ions. The latter are marked with an asterisk. The ion at m/z 261 corresponds to the protonated molecule of the HEPES buffer (sodium salt).

Table 1. Identified compounds based on ESI-MS analysis and their normalized relative abundances at two different reaction times, glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems

Ions of interest	Reactions systems (guanidine with glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, and 1-phenyl-1,2-propanedione)			
	m/z $[M + H]^+$ or $[M + Na]^{+f}$ (Rel. abundances in %)			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl	1-Phenyl-1,2-propanedione
Dihydroxyimidazolidine (1a)	118 (58.0; ^a 10.3 ^b)	132 (12.5; ^a b,c)	146 (45.7; ^d b,c)	208 (45.8; ^a 2.3 ^b)
Hydroimidazolone (2a)	100 (3.6; 0.8)	114 (4.0; 1.5)	128 (5.3; ^c)	190 (11.8; 0.5)
Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O (3a)	e	e	110 (^c ; 1.3)	172 (1.8; 5.9)
Bis(dihydroxyimidazolidine) (1b)	e	e	232 (38.2; 0.6)	356 (5.7; ^c)
Bis(dihydroxyimidazolidine) – H ₂ O (2b)	e	e	214 (36.5; 362)	338 (12.2; 52.7)
Bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H ₂ O (3b)	e	e	196 (2.4; 19.9)	320 (2.9; 3.5)
Tetrahydropyrimidine (1c)	e	204 (^c ; 1.8)	e	e
Tetrahydropyrimidine – H ₂ O (2c)	e	186 (3.1; ^c)	e	e
Bis(dihydroxyimidazolidine) (3c) ^f	e	226 (^c ; 7.7)	e	e

^a Reaction time 30 min.

^b Reaction time 1 day.

^c Relative ion abundances <0.5%.

^d Reaction time 5 min.

^e Ions not detected.

^f Singly sodiated molecules, $[M + Na]^+$.

The relative ion abundances presented are normalized to the m/z 261 ion of the buffer compound HEPES.

Table 2. Identified compounds based on ESI-MS analysis and their normalized relative abundances at two different reaction times; 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione reaction systems

Ions of interest	Reactions systems (guanidine with 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione) m/z $[M + H]^+$ or $[M + Na]^+$ ^f (Rel. abundances in %)		
	2,3-pentanedione	2,3-hexanedione	3,4-hexanedione
Dihydroxyimidazolidine (1a)	160 (21.5; ^a b,c)	174 (19.3; ^d b,c)	174 (5.1; ^a b,c)
Hydroimidazolone (2a)	142 (3.2; ^b)	156 (12.2; 1.3)	156 (7.1; 3.0)
Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O (3a)	124 (^b ; 21.9)	138 (20.8; 73.0)	138 (18.4; 473)
Bis(dihydroxyimidazolidine) (1b)	260 (17.6; ^b)	288 (11.4; ^b)	^e
Bis(dihydroxyimidazolidine) – H ₂ O (2b)	242 (56.4; 91.3)	270 (54.8; 90.5)	270 (56.1; 37.2)
Bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H ₂ O (3b)	^e	^e	^e
Tetrahydropyrimidine (1c)	^e	^e	^e
Tetrahydropyrimidine – H ₂ O (2c)	^e	^e	^e
Bis(dihydroxyimidazolidine) (3c) ^f	^e	^e	^e
(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1d/2d)	224 _{n=1} (2.4; 6.1)/ 324 _{n=2} (^b ; 1.5)	252 _{n=1} (8.5; 21.1)/ 366 _{n=2} (2.0; 1.1)	252 _{n=1} (14.1; 339)/ 366 _{n=2} (0.5; 28.6)
{(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarb) _n } – H ₂ O (3d/4d)	206 _{n=1} (^b ; 5.6)/ 306 _{n=2} (^b ; 2.0)	234 _{n=1} (^b ; 14.4)/ 348 _{n=2} (^b ; 0.6)	234 _{n=1} (^b ; 27.6)/ 348 _{n=2} (^b ; 89.4)
{(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + hydroimidazolone} + (dicarb) _n (1e/2e)	265 _{n=0} (^b ; 51.6)/ 365 _{n=1} (^b ; 1.3)	293 _{n=0} (^b ; 126)/ 407 _{n=1} (^b ; 0.5)	293 _{n=0} (^b ; 493)/ 407 _{n=1} (^b ; 27.6)
2(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1f/2f)	247 _{n=0} (^b ; 2.8)/ 347 _{n=1} (^b ; 2.7)	275 _{n=0} (^b ; 23.1)/ 389 _{n=1} (^b ; 2.0)	275 _{n=0} (^b ; 503)/ 389 _{n=1} (^b ; 153)

^a Reaction time 5 min.^b Relative ion abundances <0.5%.^c Reaction time 1 day.^d Reaction time 30 min.^e Ions not detected.^f Singly sodiated molecules, $[M + Na]^+$.

Dicarb stands for dicarbonyl.

The bottom table lines present the ion moieties observed for the alkyl-diketonic dicarbonyl reaction systems, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione.

The relative ion abundances presented are normalized to the m/z 261 ion of the buffer compound HEPES.

buffer ions do not appear to cause any relevant suppression effect.³⁰ Furthermore, it was observed that, in general, the buffer compound ions, at m/z 239 (261 Da–23 Da (Na)), and dihydroxyimidazolidines (ions **2**) reacted to form a new compound (not shown).

Identification and characterization of reaction products

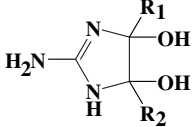
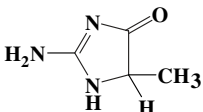
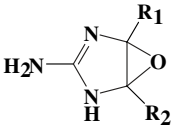
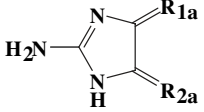
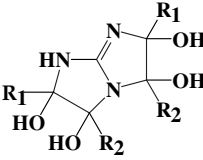
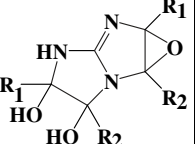
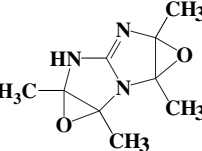
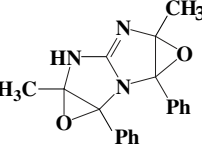
On the basis of the ESI-MS² spectra (not shown), ion structures for the ions of interest presented in Tables 1 and 2 are proposed (Tables 3 and 4). These attributions are sustained, as described below, by the fragment ion composition depicted in Tables 5 and 6. In order to make the discussion on the ion structure attributions more clear, the ions of interest presented in Tables 1 and 2 were grouped into six main classes (a–f) according to the more structurally related ions. These ion classes encompass the following ions: ions **1a**, **2a**, and **3a** (class a); ions **1b**, **2b**, and **3b** (class b); ions **1c**, **2c**, and **3c** (class c); ions **1d**, **2d**, **3d**, and **4d** (class d); ions **1e** and **2e** (class e); ions **1f** and **2f** (class f).

Class a (ions **1a–3a**)

The fragmentation of ions **1a**, at m/z 118 (glyoxal), 132 (methylglyoxal), 146 (diacetyl), 208 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 160 (2,3-pentanedione), and 174 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), is depicted in Tables 5 and 6. These ions exhibit a similar fragmentation, with a prominent loss of a water molecule and, to a less extent, the loss of a dicarbonyl molecule. These water and dicarbonyl losses were attributed to an imidazolidine ring formation (Table 3 – ions **1a**). The dicarbonyl loss (Tables 5 and 6), leading to protonated guanidine molecules, was found to be more important for the diketonic dicarbonyls diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione.

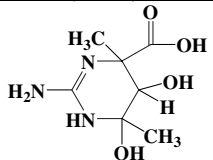
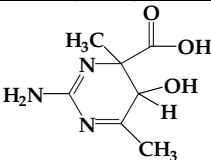
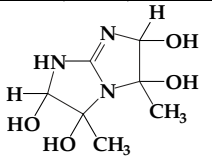
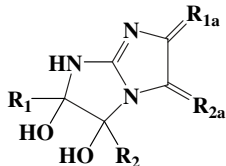
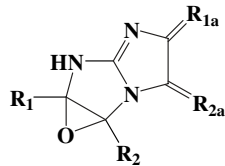
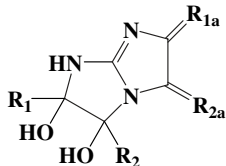
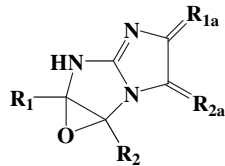
In the fragmentation patterns of the ions **2a**, at m/z 100 (glyoxal), 114 (methylglyoxal), 128 (diacetyl), 190 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 142 (2,3-pentanedione), and 156 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), the loss of CO was predominant for glyoxal and methylglyoxal (Table 5). The 28 Da loss corresponding to C₂H₄ was

Table 3. Proposed ion structures for the compounds of interest identified in the ESI mass spectra; ions **1a–1d** and **3d** (Tables 1 and 2)

Reaction systems	Possible ion structures ^a					
	Dihydroxy-imidazolidine (ions 1a)	Hydroimidazolone (ions 2a)	Dihydroxy-imidazolidine – 2H ₂ O (ions 3a)	Bis(dihydroxy-imidazolidine) (ions 1b)	Bis(dihydroxy-imidazolidine)–H ₂ O (ions 2b)	Bis(dihydroxy-imidazolidine)–2H ₂ O (ions 3b)
Methylglyoxal			----	----	----	----
Glyoxal						
Diacyetyl						
2,3-Pentanedione						----
2,3-Hexanedione and 3,4-Hexanedione						
1-Phenyl-1,2-propanedione						

(continued overleaf)

Table 3. (Continued)

Reaction systems	Possible ion structures ^a				
	Tetrahydropyrimidine (ion 1c)	Tetrahydropyrimidine– H ₂ O (ion 2c)	Bis(dihydroxyimidazolidine) (ion 3c) ^b	(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O) + dicarbonyl (ions 1d)	{(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O) + dicarbonyl} – H ₂ O (ions 3d)
Methylglyoxal				----	----
Glyoxal	----	----	----	----	----
Diacetyl				----	----
2,3-Pentanedione					
2,3-Hexanedione and 3,4-Hexanedione					
1-Phenyl-1,2-propanedione				----	----

^a All ion structures proposed refer to singly protonated molecules, [M + H].^b Adduct ion of the type [M + Na]⁺.

---- Not detected.

R1 = H (glyoxal and methylglyoxal), CH₃ (diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 1-phenyl-1,2-propanedione) and CH₂CH₃ (3,4-hexanedione). R_{1a} = R₁ – H.R2 = H (glyoxal), CH₃ (methylglyoxal and diacetyl), CH₂CH₃ (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione), CH₂CH₂CH₃ (2,3-hexanedione) and phenyl (1-phenyl-1,2-propanedione). R_{2a} = R₂ – H.

Table 4. Proposed ion structures for the compounds of interest identified in the ESI mass spectra; ions **1d–2f** (Table 2)

Reaction systems	Possible ion structures ^a			
	(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarbonyl) _n [Ions 1d ^b (<i>n</i> = 1); ions 2d (<i>n</i> = 2)]	{(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarbonyl) _n } – H ₂ O [Ions 3d ^b (<i>n</i> = 1); ions 4d (<i>n</i> = 2)]	{(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + hydroimidazolone} + (dicarbonyl) _n [Ions 1e (<i>n</i> = 0); ions 2e (<i>n</i> = 1)]	2(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + (dicarbonyl) _n [Ions 1f (<i>n</i> = 0); ions 2f (<i>n</i> = 1)]
2,3-Pentanedione/ 2,3-Hexanedione/ 3,4-Hexanedione				

^a All ion structures proposed refer to singly protonated molecules, [M + H]⁺.^b Ion structures also presented in Table 3.R₁ = CH₃ (2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione) and CH₂CH₃ (3,4-hexanedione). R_{1a} = R₁ – H.R₂ = CH₂CH₃ (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione) and CH₂CH₂CH₃ (2,3-hexanedione). R_{2a} = R₂ – H.

Table 5. Relative abundances (%) of fragment ions (ESI-MS² analysis) derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 1), for glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (Precursor ion: glyoxal/methylglyoxal/diacetyl/1-phenyl-1,2-propanedione)					
	Dihydroxyimidazolidine (ions 1a)	Hydroimidazolone (ions 2a)	Dihydroxy-imidazolidine–2H ₂ O (ions 3a)	Bis(dihydroxy-imidazolidine) (ions 1b)	Bis(dihydroxy-imidazolidine)–H ₂ O (ions 2b)	Bis(dihydroxy-imidazolidine)–2H ₂ O (ions 3b)
Fragment ion composition	118/132/146/208	100/114/128/190	– / – /110/172	– / – /232/356	– / – /214/338	– / – /196/320
[M + H – NH ₃] ⁺	–	– / – /100/4.2	–	–	–	– / – /12.1/ –
[M + H – H ₂ O] ⁺	100/100/100/100	– / – /1.9/15.5	–	– / – /43.5/41.0	– / – /18.0/100	– / – /54.0/15.9
[M + H – CHN] ⁺	–	–	– / – / – /0.8	–	–	–
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / – /100/100	–	–
[M + H – H ₂ O – CO] ⁺	0.5/ – / – / –	–	–	–	–	–
[M + H – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	– /13.6/1.9/4.4	–	–	–	– / – /0.8/ –	– / – /2.8/3.2
[M + H – CO] ⁺	–	100/100/ – / –	–	–	–	–
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	–	– / – /78.8/100	–	–	–	– / – / – /4.9
[M + H – C ₃ H ₄] ⁺	–	– / – /34.4/ –	–	–	–	–
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	–	– /2.2/ – /25.8	– / – / – /100	–	–	– / – /71.4/20.9
[M + H – C ₂ H ₃ N] ⁺	–	–	– / – / – /6.5	–	–	–
[M + H – C ₄ H ₄ O ₂] ⁺	–	–	–	–	–	– / – /15.0/ –
[M + H – dicarb] ⁺	0.9/0.6/43.0/22.7	–	–	–	– / – /100/0.7	–
[(M + H – H ₂ O) – dicarb] ⁺	–	–	–	–	– / – / – /11.9	–
[(M + H – H ₂ O) – dicarb] – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / – / – /6.1	–	–
[(M + H – dicarb) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / – / – /0.7	–	–
[M + H – guanidine] ⁺	–	–	–	–	– / – / – /45.6	– / – /27.2/20.6
[M + H – guanidine – C ₂ H ₄] ⁺	–	–	–	–	– / – / – /4.3	–
[M + H – C ₇ H ₇ NO] ⁺	–	–	–	– / – / – /2.1 –	–	– / – / – /100
[M + H – guanidine – C ₇ H ₇ NO] ⁺	–	–	–	–	– / – / – /5.2	–
[M + H – C ₉ H ₆ O ₂] ⁺	–	–	–	–	–	– / – / – /27.7
Relative ion abundances (%)	Tetrahydropyrimidine (ions 1c)	Tetrahydropyrimidine – H ₂ O (ions 2c)		Bis(dihydroxyimidazolidine) (ions 3c)		
Fragment ion composition	– /204/ – / –	– /186/ – / –		– /226/ – / –		
[M + H – NH ₃] ⁺	– /0.6/ – / –	–		–		
[M + H – H ₂ O] ⁺	– /100/ – / –	– /0.9/ – / –		– /100/ – / –		
[M + H – HCOOH] ⁺	– /11.9/ – / –	–		–		
[(M + H – H ₂ O – CO ₂)] ⁺	– /1.2/ – / –	–		–		
[M + H – dicarb] ⁺	– /0.5/ – / –	–		–		
[M + H – C ₃ H ₄ O ₂] ⁺	–	– /100/ – / –		– /3.6/ – / –		
[M + H – C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	–	– /18.4/ – / –		–		

---Not detected.

Dicarb stands for dicarbonyl.

Table 6. Relative abundances (%) of fragment ions (ESI-MS² analysis), derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 2), for 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione reaction systems

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (Precursor ion: 2,3-pentanedione/2,3-hexanedione/3,4-hexanedione)				
	Dihydroxyimidazolidine (ions 1a)	Hydroimidazolone (ions 2a)	Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O (ions 3)	Bis(dihydroxyimidazolidine) (ions 1b)	Bis(dihydroxyimidazolidine)– 2H ₂ O (ions 2b)
Fragment ion composition	<i>m/z</i> : 160/174/174	<i>m/z</i> : 142/156/156	<i>m/z</i> : 124/138/138	<i>m/z</i> : 260/288/–	<i>m/z</i> : 242/270/270
[M + H – NH ₃] ⁺	–	20.3/12.6/–	100/0.5/4.3	–	–
[M + H – H ₂ O] ⁺	100/100/100	21.9/100/100	–	16.6/23.8/–	7.0/21.9/100
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	100/100/–	–
[M + H – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	0.7/–/–	–	–	–	–
[M + H – CHN] ⁺	–	–	25.5/–/1.3	–	–
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	–	100/54.4/–	–/100/2.9	–	–
[M + H – C ₂ H ₃ N] ⁺	–	–	26.1/72.4/1.0	–	–
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	–	7.3/5.8/–	–/33.0/1.5	–	–
[M + H – C ₃ H ₅ N] ⁺	–	–	–/–/100	–	–
[M + H – C ₄ H ₆ N ₂] ⁺	–	–	–/–/1.7	–	–
[M + H – C ₂ H ₄ – CH ₂ N ₂] ⁺	–	14.3/9.8/–	–	–	–
[M + H – dicarb] ⁺	–/11.5/27.9	–	–	–	100/100/14.1
[(M + H – dicarb) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	–	30.4/35.2/19.2

(continued overleaf)

Table 6. (Continued)

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (Precursor ion: 2,3-pentanedione/2,3-hexanedione/3,4-hexanedione)			
	(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O) + dicarbonyl (ions 1d)	{(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O) + dicarbonyl}– H ₂ O (ions 3d)	(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O)+ (dicarbonyl) ₂ (ions 2d)	{(Dihydroxyimidazolidine– 2H ₂ O) + (dicarbonyl) ₂ } – H ₂ O (ions 4d)
Fragment ion composition	<i>m/z</i> : 224/252/252	<i>m/z</i> : 206/234/234	<i>m/z</i> : 324/366/366	<i>m/z</i> : 306/348/348
[M + H – H ₂ O] ⁺	98.0/68.4/40.1	100/100/100	100/100/100	100/100/52.7
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	1.2/ – /6.0	1.0/ – / –
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	– / – /2.9	19.7/5.3/2.7	–	– / – /3.4
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	2.5/ – / –	15.6/11.6/1.4	–	–
[M + H – H ₂ O – C ₂ H ₂ O] ⁺	–	–	–	59.6/ – / –
[(M + H – C ₃ H ₄ O) ⁺	5.6/ – / –	11.3/ – / –	–	– / – /4.7
[M + H – C ₄ H ₈] ⁺	–	– /19.1/ –	–	–
[M + H – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	–	0.7/2.1/1.9	–	–
[M + H – H ₂ O – C ₃ H ₄ O] ⁺	–	–	–	1.0/ – /7.3
[M + H – C ₄ H ₆ O] ⁺	– /30.3/ –	59.6/11.1/ –	–	–
[M + H – H ₂ O – C ₄ H ₆ O] ⁺	–	–	–	2.2/ – / –
[M + H – C ₅ H ₈ O] ⁺	–	– /1.8/ –	–	–
[M + H – dicarb] ⁺	100/100/100	–	7.5/12.0/27.2	2.6/ – /1.5
[M + H – (dicarb + 2H)] ⁺	–	–	–	3.6/ – /0.6
[M + H – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	–	0.7/0.7/0.7	–	–
[M + H – guanidine] ⁺	1.8/ – / –	–	–	–
[M + H – (dihydroxyimid – 2H ₂ O + 2H)] ⁺	–	–	–	3.2/3.7/ –
[M + H – (hydroimid – 2H)] ⁺	–	–	–	– / – /38.8
[M + H – (hydroimid – 2H) – C ₂ H ₄] ⁺	–	–	–	– / – /95.2
[(M + H – dicarb) – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	–	–	4.7/8.5/1.9	59.6/39.5/100
[M + H – 2dicarb] ⁺	–	–	2.0/1.5/18.6	–

Table 6. (Continued)

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (Precursor ion: 2,3-pentanedione/2,3-hexanedione/3,4-Hexanedione)			
	(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + hydroimidazolone (ions 1e)	2(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) (ions 1f)	{(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + hydroimidazolone} + dicarbonyl (ions 2e)	2(Dihydroxyimidazolidine – 2H ₂ O) + dicarbonyl (ions 2f)
Fragment ion composition	<i>m/z</i> : 265/293/293	<i>m/z</i> : 247/275/275	<i>m/z</i> : 365/407/407	<i>m/z</i> : 347/389/389
[M + H – NH ₃] ⁺	71.3/100/100	– /1.3/ –	12.5/100/55.3	–
[M + H – H ₂ O] ⁺	47.8/69.3/42.3	–	100/65.4/100	17.7/18.9/2.4
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	2.9/ – /0.7
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	1.4/19.8/18.4	–	0.7/3.1/ –	–
[M + H – guanidine] ⁺	100/79.4/56.8	–	35.5/48.8/45.3	2.0/0.5/ –
[(M + H – guanidine) – dicarb] ⁺	–	–	0.5/1.7/1.0	–
[M + H – C ₄ H ₇ N ₃] ⁺	–	32.0/9.3/ –	–	15.7/1.5/ –
[M + H – C ₅ H ₉ N ₃] ⁺	–	– / – /32.8	–	– / – /8.7
[M + H – H ₂ O – C ₄ H ₇ N ₃] ⁺	1.0/0.8/ –	–	–	–
[M + H – C ₅ H ₇ N ₃] ⁺	–	9.5/15.3/ –	–	–
[M + H – C ₆ H ₉ N ₃] ⁺	–	– / – /11.3	–	–
[M + H – H ₂ O – C ₅ H ₇ N ₃] ⁺	7.9/10.7/5.7	–	–	–
[M + H – C ₆ H ₇ N ₅] ⁺	–	3.2/0.7/ –	–	2.1/ – / –
[M + H – C ₇ H ₉ N ₅] ⁺	–	– / – /3.9	–	– / – /1.1
[M + H – H ₂ O – C ₆ H ₇ N ₅] ⁺	–	–	–	0.6/ – / –
[M + H – dicarb] ⁺	–	–	0.5/2.0/ –	37.8/46.4/11.5
[M + H – (dihydroxyimid – 2H ₂ O)] ⁺	– /28.8/18.8	100/100/100	0.7/5.9/ –	100/100/100
[(M + H – H ₂ O) – (dihydroxyimid – 2H ₂ O)] ⁺	12.9/47.0/26.4	–	4.4/10.1/6.6	–
[(M + H – H ₂ O) – (dihydroxyimid – 2H ₂ O) – dicarb] ⁺	–	–	– /0.5/0.9	–
[M + H – (dihydroxyimid – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	23.3/17.0/0.9
[M + H – (dihydroxyimid – H ₂ O) – dicarb] ⁺	–	–	–	28.6/43.0/7.0
[(M + H – dicarb) – C ₄ H ₇ N ₃] ⁺	–	–	–	1.3/0.6/ –

---Not detected.

Dicarb, dihydroxyimid, and hydroimid stand for dicarbonyl, dihydroxyimidazolidine, and hydroimidazolone, respectively.

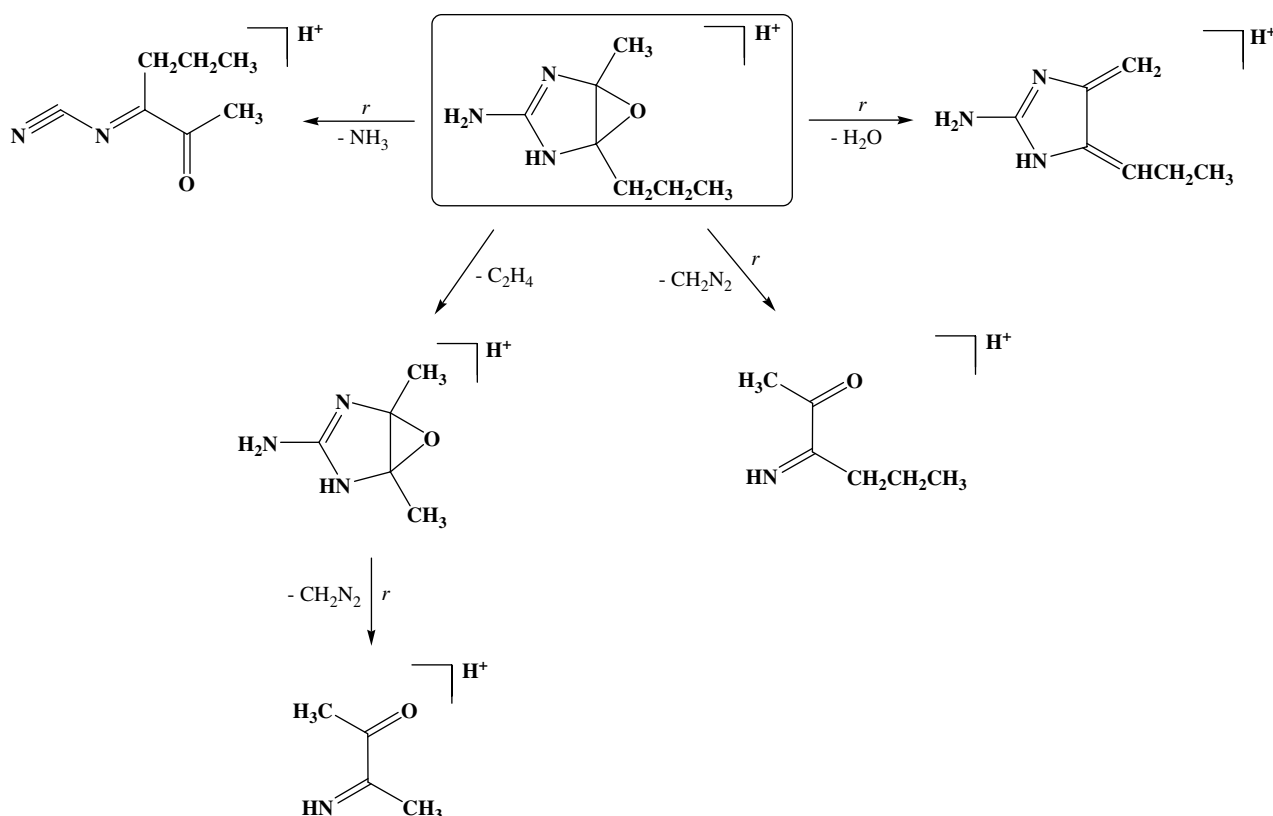
attributed to the diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, and 2,3-hexanedione dicarbonyls (Tables 5 and 6), in particular. Moreover, the loss of one water molecule was observed for the diketonic dicarbonyls reactions only (Tables 5 and 6). This situation can be explained by the formation of an epoxy group in the imidazole rings, instead of a carbonyl group (methylglyoxal reaction). Furthermore, other losses from ions **2a**, such as NH_3 and CH_2N_2 , were also observed (Tables 5 and 6), suggesting that a reaction moiety, more stable than the one for ions **1a**, was formed. As can be seen in Scheme 1, for the 2,3-hexanedione reaction system, the losses of C_2H_4 , H_2O , NH_3 , and CH_2N_2 are indicative of an imidazolone ring formation. The structure of the protonated hydroimidazolone molecules (Table 3) was attributed to ions **2a**. In addition, and for comparative purposes, creatinine (Fig. 1) was investigated because this compound is a simple hydroimidazolone. The ESI- MS^2 spectra (not shown) of the m/z 114 ion (protonated molecule of creatinine) exhibited a unique peak corresponding to the loss of CO, similar to that observed for the ions **2a** glyoxal-derived hydroimidazolone (Table 5). This is therefore consistent with the fragmentation of ions **2a**.

With respect to ions **3a**, the ions at m/z 172 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 124 (2,3-pentanedione), and 138 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2) showed mainly common losses of $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ and CH_2N_2 (Table 5). The former loss appears to involve the presence of the primary dicarbonyl substituents, i.e. the alkyl groups (methyl or ethyl). These losses argue for the formation of a new reaction moiety, in comparison to what was proposed

for ions **1a** and **2a**. The structure attributed to ions **3a** (Table 3) seems therefore to be related to the structures attributed to ions **1a** and **2a**. This assumption is based on the fact that losses from the imidazole ring, such as CH_2N_2 and CHN , and a loss involving the methyl group ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) or ethyl group (3,4-hexanedione) of the dicarbonyl molecules, appear to be more important in the fragmentation of ions **3a** than in the fragmentation of ions **1a** and **2a**. That is to say, the more dehydrated the precursor ion is, as in ions **3a**, the more fragmentation occurs upon the imidazole ring formed. Hence, the doubly dehydrated dihydroxyimidazolidine protonated molecules structure, or more simply designated (dihydroxyimidazolidine – $2\text{H}_2\text{O}$) (Table 3), was attributed to ions **3a**. However, it should be noted that the elimination of one water molecule from hydroimidazolones is only a minor contribution to the formation of (dihydroxyimidazolidine – $2\text{H}_2\text{O}$) moieties, since hydroimidazolones, as far as the diketonic dicarbonyls reaction systems are concerned, appear to be more stable than their precursor dihydroxyimidazolidines. Furthermore, the results we obtained from the ESI- MS^2 analysis, show that the more energetic fragmentation observed from the imidazole ring, e.g. CHN , $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$, and CH_2N_2 , becomes more important in the following order: ions **1a** < ions **2a** < ions **3a** (Tables 5 and 6).

Class b (ions **1b**–**3b**)

The ions **1b**, at m/z 232 (diacetyl), 356 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 260 (2,3-pentanedione), and 288 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2) revealed



Scheme 1. Fragmentation of the protonated molecule of (dihydroxyimidazolidine – $2\text{H}_2\text{O}$) (ion **2a**), which was proposed for the 2,3-hexanedione reaction system. *r* stands for rearrangement.

a similar fragmentation behavior with the loss of two water molecules, as depicted in Tables 5 and 6. In order to more clearly attribute an ion structure to ions **1b**, the fragmentation pattern of the closely related ions **2b** and **3b** is discussed first. Ions **2b**, at m/z 214 (diacetyl), 338 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 242 (2,3-pentanedione), and 270 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), showed a fragment ion composition that includes the loss of one water molecule followed by the loss of one dicarbonyl molecule (Table 5). The loss of one water molecule can also occur after the loss of one dicarbonyl molecule (Table 6), as can be observed in the fragmentation scheme proposed for ions **2b** (Scheme 2) for the 2,3-hexanedione reaction system. The observation that the loss of one water molecule may occur after or before the loss of one dicarbonyl molecule seems to suggest that two dicarbonyl molecules react with the guanidine amino compound. Furthermore, accounting for the fact that ions **2b** were only observed for the diketonic dicarbonyls reaction systems, two molecules of dicarbonyl should react with guanidine, and individually lead to the formation of two dihydroxyimidazolidine moieties. Therefore, ions **2b** structure should include one hydroimidazolone and one dihydroxyimidazolidine moiety. Hence, the structure of the protonated molecule of [bis(dihydroxyimidazolidine) – H₂O] was attributed to ions **2b** (Table 3).

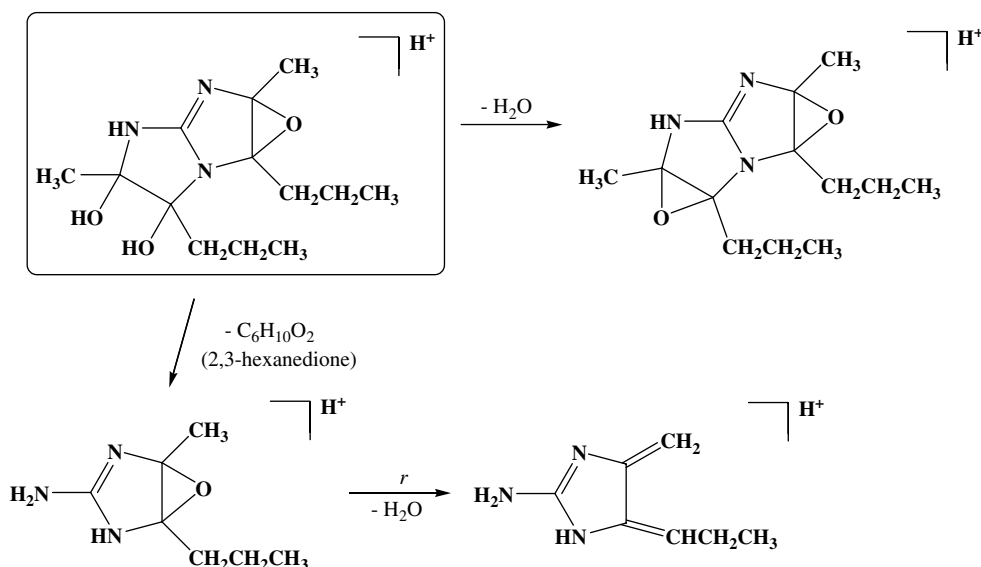
The fragment ion composition of ions **3b** showed losses of NH₃, CH₂N₂, and guanidine. These losses are indicative of the formation of stable reaction moieties, in which the fragmentation of the imidazole rings prevails. Losses of one water molecule, C₄H₄O₂ (diacetyl), C₇H₇NO (1-phenyl-1,2-propanedione), and C₉H₆O₂ (1-phenyl-1,2-propanedione), in the fragment ion composition of these ions can be ascribed to the presence of hydroimidazolone moieties. The three latter losses also reflect the presence of characteristic dicarbonyl substituents (methyl and phenyl) in the hydroimidazolone moieties. Furthermore, the absence of a dicarbonyl loss in the fragment ion composition of ions **3b** argues for the presence

of two hydroimidazolone moieties in the structure of these ions. Therefore, we attribute the structure of the protonated molecule of [bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H₂O] to ions **3b** (Table 3).

It should be noted that ions **3b** fragment ion composition is similar to the one observed for ions **2a** and **3a** (Tables 5 and 6), with specific losses from the imidazole rings. With respect to ions **1b** and **2b**, their fragmentation patterns are similar to the one depicted for ions **1a** (Tables 5 and 6). Thus, the fact that ions **1b**, **2b**, and **3b** differ from each other by 18 Da, similar to ions **1a**, **2a**, and **3a**, suggests that ions **1b** possess two dihydroxyimidazolidine moieties in their ion structure. The structure of the protonated molecule of bis(dihydroxyimidazolidine) was therefore attributed to these latter ions (Table 3). Moreover, the fragment ion composition of ions **1b**, **2b**, and **3b** is consistent with the dehydration of precursor ions, in which the increased dehydration leads to more fragmentation of the imidazole rings formed. Furthermore, it is important to note that ions **3b** were only observed for the diacetyl and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems.

Class c (ions **1c**–**3c**)

The ions at m/z 204 (ion **1c**), 186 (ion **2c**), and 226 (ion **3c**) were only observed for the methylglyoxal reaction system (Table 1). The fragment ion composition of ion **1c** exhibits a prominent loss of one water molecule (Table 5). The losses of CO₂, HCOOH, and dicarbonyl were also observed (Table 5). These losses seem to be indicative of the formation of a more substituted ring than the ones proposed for ions **1a**–**3b**. The structure of the protonated molecules of tetrahydropyrimidine (THP) was attributed to ion **1c** (Table 3). This attribution is consistent with the fact that, for a reaction product observed in the model reaction of blocked arginine with methylglyoxal, namely, the THP compound, Oya *et al.* proposed a similar ion structure.³² This THP compound possesses a highly substituted pyrimidine ring with a carboxyl group.



Scheme 2. Fragmentation of the protonated molecules of [bis(dihydroxyimidazolidine) – H₂O] (ion **2b**), proposed for the 2,3-hexanedione reaction system. *r* stands for rearrangement.

The ion at m/z 186 (ion **2c**) eliminated one water molecule and one α,β -unsaturated carboxylic acid molecule ($C_3H_4O_2$) (Table 5). The loss of a carboxylic acid ($C_3H_6O_2$), more saturated than the $C_3H_4O_2$ molecule, was also observed in ion **8c** fragment ion composition. These losses are indicative of the formation of a highly substituted reaction moiety. Moreover, the loss of one α,β -unsaturated carboxylic acid molecule, as well as of one more saturated carboxylic acid molecule, was also reported for some precursor ions in a previous study, in which a blocked arginine had been used.²⁷ In that report, these precursor ions corresponded to the protonated molecules of (acetyl-tetrahydropyrimidine – H_2O). Hence, in the present study, the structure of the protonated (THP – H_2O) molecule (Table 3) was attributed to ion **2c**. It should, however, be emphasized, that after ion **2c** loses one α,β -unsaturated carboxylic acid molecule, the protonated molecule of hydroimidazolone (ion **2a**) appears as fragment ion. In addition, after ion **2c** loses a more saturated carboxylic acid molecule, the protonated molecules of an hydroimidazolone derivative, structurally similar to 5-methylimidazolone,⁹ result as fragment ions.

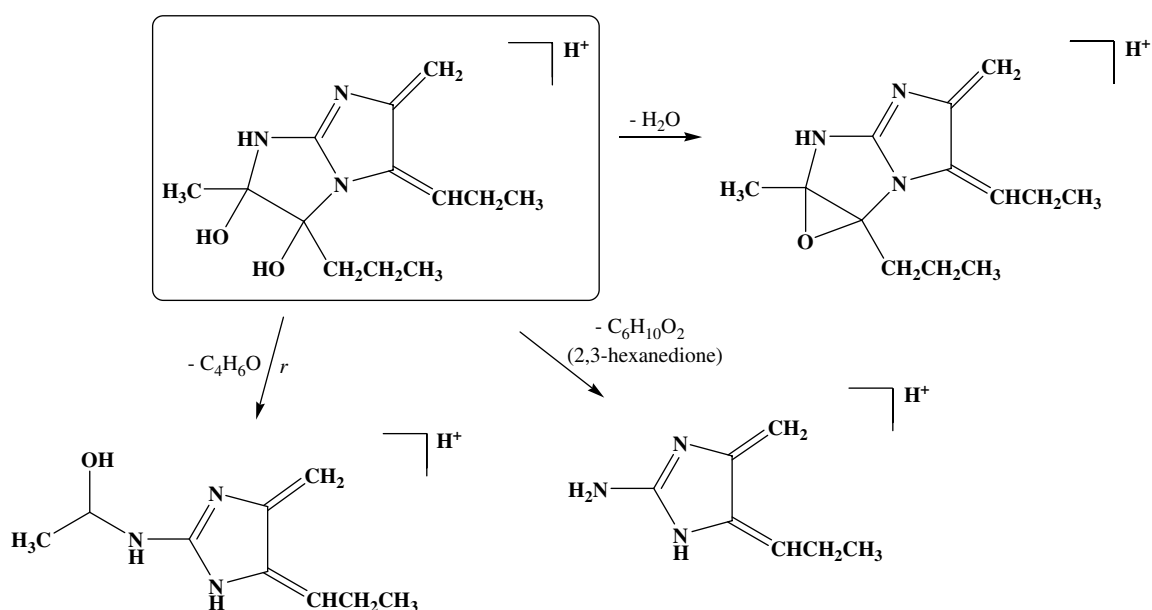
Ion **3c** (methylglyoxal) fragment ion composition showed a prominent loss of water and a minor loss of a dicarbonyl molecule (Table 5), leading to m/z 208 and 154 ions, respectively. These ions were also observed in the ESI mass spectra (Fig. 2). The ESI-MS² spectra of m/z 154 and 208 ions preferably lose one water and one dicarbonyl molecule (not shown), respectively, leading to the formation of a m/z 136 fragment ion. An ion at m/z 136 was also observed in the ESI mass spectra (Fig. 2), the fragmentation of this ion suggested the loss of one water molecule and $CH_2N_2 + Na$ (65 Da) (not shown). This m/z 136 ion was found to be very stable. This observation, together with the specific loss of $(CH_2N_2 + Na)$ observed, led us to assign it to the singly sodiated adduct of the methylglyoxal-derived hydroimidazolone (ion **2a**). Since m/z 136 and 154 ions differ by 18 Da, we can attribute the latter ion to the singly sodiated adduct of

the methylglyoxal-derived dihydroxyimidazolidine (ion **1a**). Taking into account these observations, and considering that in the fragmentation of m/z 226 precursor ion m/z 154 appears as fragment ion, the structure of the singly sodiated molecule of the bis(dihydroxyimidazolidine) was attributed to ion **3c** (Table 3). It is to be noted that the ion structure attributed is not usual for the aldehydic dicarbonyls reactions. Its formation may, however, be justified owing to the stability of the precursor dihydroxyimidazolidine and hydroimidazolone sodiated adducts.

Class d (ions **1d–4d**)

The ions **1d** and **2d**, at m/z 224 (2,3-pentanedione), 252 (2,3- and 3,4-hexanedione), 324 (2,3-pentanedione), and 366 (2,3- and 3,4-hexanedione), were only observed for the heavier alkyl-diketonic dicarbonyl reaction systems, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione (Table 2). Prominent losses of water and dicarbonyl were observed for ions **1d** at m/z 224 and 252 ions (Table 6). The subsequent loss of one dicarbonyl molecule from ions at m/z 224 (2,3-pentanedione) and 252 (2,3- and 3,4-hexanedione), examined by ESI-MS² analysis, was found to lead to the fragment ions at m/z 124 (2,3-pentanedione) and 138 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione), respectively. Considering that, in the course of the reaction time, the relative abundances of m/z 124 and 138 ions increased, we may postulate that ions **1d** result from the reaction of (dihydroxyimidazolidine – $2H_2O$) moieties with one dicarbonyl molecule. Thus, the designation of (dihydroxyimidazolidine – $2H_2O$) + dicarbonyl, and corresponding ion structures, were attributed to ions **1d**, as shown in Tables 3 and 4. Moreover, in order to better elucidate the fragmentation behavior of these ions, a fragmentation scheme is presented for ions **1d** (Scheme 3) for the 2,3-hexanedione reaction system, as an example.

The ions **2d**, at m/z 324 (2,3-pentanedione) and 366 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), revealed similar fragment



Scheme 3. Fragmentation of the protonated molecules of [(dihydroxyimidazolidine – $2H_2O$) + dicarbonyl] (ion **1d**), proposed for the 2,3-hexanedione reaction system. *r* stands for rearrangement.

ion compositions, with losses of one to two water molecules and one to two dicarbonyl molecules. The subsequent loss of one dicarbonyl molecule from m/z 324 and 366 ions leads to fragment ions at m/z 224 and 252, which were found to be ions **1d** according to the ESI-MS³ analysis (not shown). To reinforce this assumption, when we analyze the ion structure attributed to ions **1d** (Table 3) it can reasonably be concluded that a dicarbonyl molecule can react with the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. In addition, it was observed, by means of ESI-MS², that m/z 324 and 366 ions lose two dicarbonyl molecules to give m/z 124 and 138 fragment ions (ions **3a**), respectively, similar to what has been observed for ions **1d**. Accounting for the described fragment ion compositions, the structures of the protonated molecules of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + (dicarbonyl)₂ moieties were attributed to ions **2d** (Table 3).

With respect to ions **3d**, at m/z 206 (2,3-pentanedione) and 234 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), a fragment ion composition similar to what has previously been described, including the losses of one water molecule, C₂H₄, and CH₂N₂, characteristic of hydroimidazolones fragmentation (Tables 5 and 6 – ions **2a**), was observed. In addition, the losses of C₃H₄O (2,3-pentanedione), C₄H₆O (2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione), and C₅H₈O (2,3-hexanedione) observed in ions **3d** fragment ion composition can also result from the epoxy group developed at the imidazole rings, together with the primary dicarbonyl substituents of 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione dicarbonyl molecules, in particular. Similar to ions **1a** and **2a**, the ions **1d** and **3d** are related by an 18 Da mass difference. They exhibit a similar fragmentation pattern with respect to the most abundant losses. For ions **3d**, a designation similar to the one proposed for ions **1d**, the protonated molecules of the [(dihydroimidazolidine – 2H₂O) + dicarbonyl] – H₂O moieties, can be adopted, with the corresponding similar ion structures, as shown in Table 4.

The ions **4d**, at m/z 306 (2,3-pentanedione) and 348 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), fragment to give prominent losses of one water molecule and also dicarbonyl + (dicarbonyl – H₂O) moieties (Table 6). The loss of dicarbonyl molecules was also observed, especially for the 2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione reaction systems (Table 6). Ions at m/z 306 (2,3-pentanedione) and 348 (3,4-hexanedione) were found to subsequently lose a dicarbonyl molecule, leading to m/z 206 and 234 fragment ions. These two latter ions were found to be ions **3d** (ESI-MS³ analysis). In addition, ESI-MS² analysis shows that ions at m/z 306 (2,3-pentanedione) and 348 (2,3- and 3,4-hexanedione) further lose the dicarbonyl + (dicarbonyl – H₂O) moiety, from which m/z 124 (2,3-pentanedione) and 138 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) ions result. The two latter fragment ions were found to correspond to ions **3a** (ESI-MS³ analysis). Similar to what occurs for ions **2d**, a dicarbonyl molecule reacts with (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties to form ions **4d** (Table 4). Taking into consideration the fragmentation behavior observed, the designation of the protonated molecules of the [(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + (dicarbonyl)₂] – H₂O moieties and corresponding ion structures were attributed to ions **4d** (Table 4).

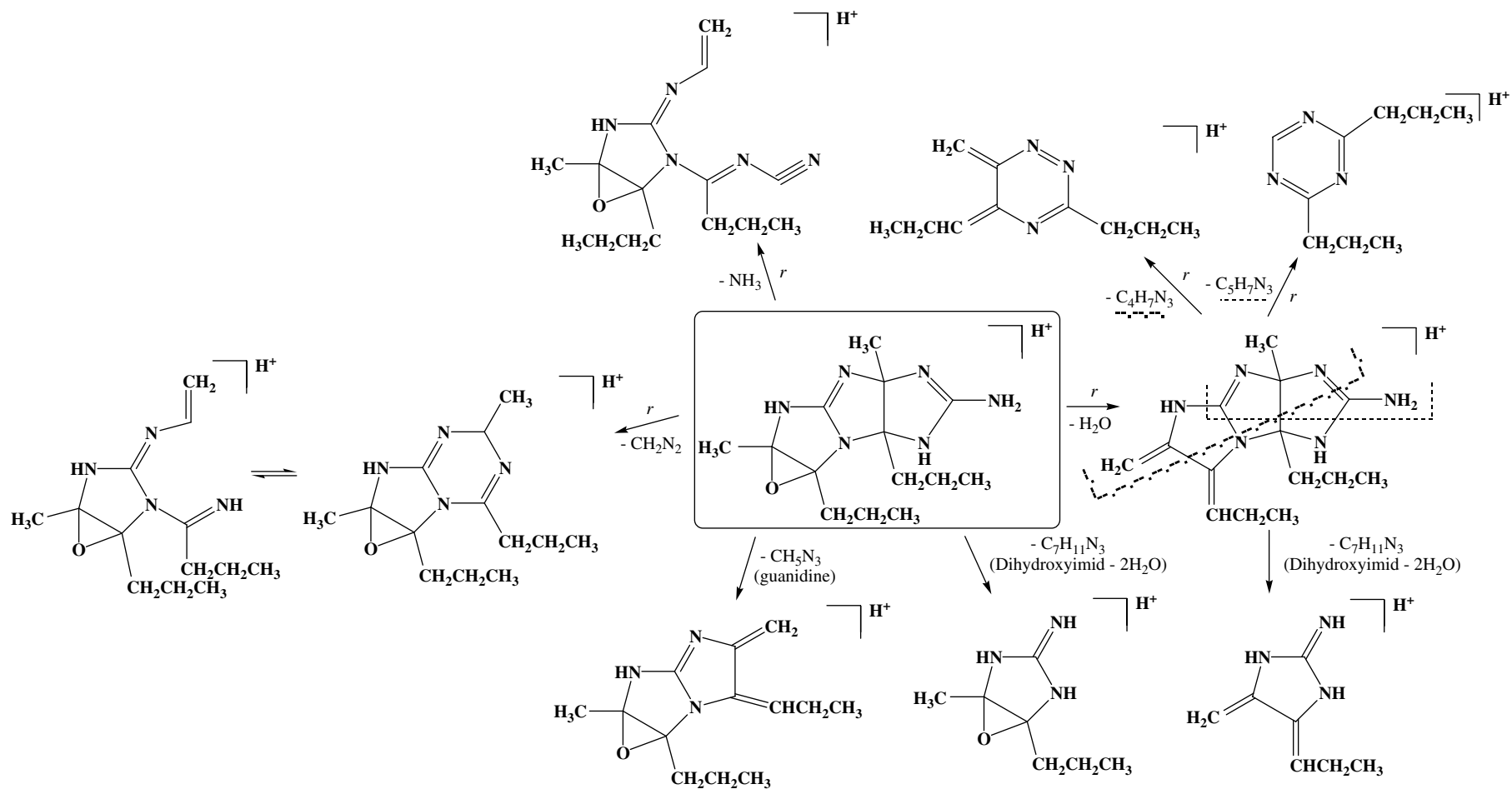
Class e (ions **1e** and **2e**)

The ions **1e**, at m/z 265 (2,3-pentanedione) and 293 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), revealed a fragment ion composition with the prominent losses of NH₃, one water molecule, CH₂H₂, and guanidine. After the elimination of one water molecule, m/z 265 and 293 further lose 123 Da (2,3-pentanedione) and 137 Da (2,3- and 3,4-hexanedione) (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O moieties), leading to the formation of fragment ions at m/z 124 (2,3-pentanedione) and 138 (2,3- and 3,4-hexanedione), respectively. According to ESI-MS³ experiments (not shown), m/z 124 and 138 fragment ions correspond to ions **3a**. Therefore, the designation of the protonated molecules of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + hydroimidazolone moiety was attributed to ions **1e**, with corresponding ion structures as depicted in Table 5. To better elucidate the fragmentation behavior of these ions, a fragmentation scheme is proposed for ions **1e** for the 2,3-hexanedione reaction system (Scheme 4). Moreover, the losses of NH₃, CH₂N₂, and guanidine observed in ions **1e** fragmentation are consistent with the presence of guanidine moieties in the structure of ions **1e** (Table 4) and hydroimidazolones fragmentation (Table 6 – ions **2a**). Furthermore, the possible reaction of one guanidine molecule with ions **3d** might possibly lead to the formation of ions **1e**, although the low relative abundances of ions **3d** could not account for the high relative abundances observed for ions **1e**. Therefore, ions **1e** appear to result from the reaction of one hydroimidazolone molecule with one (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety.

The ions **2e**, at m/z 365 (2,3-pentanedione) and 407 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), exhibit a fragment ion composition similar to the one observed for ions **1e**, with the prominent losses of NH₃, one water molecule, and guanidine. ESI-MS² analysis shows that m/z 365 (2,3-pentanedione) and 407 (2,3- and 3,4-hexanedione) ions lose one water molecule, followed by the losses of 123 Da (2,3-pentanedione) and 138 Da (2,3- and 3,4-hexanedione), from which m/z 224 (2,3-pentanedione) and 252 (2,3- and 3,4-hexanedione) ions result, respectively. Accounting for the fact that ions **1e** and **2e** present similar fragment ion compositions, at least in what the most abundant losses are concerned, and also the fact that their corresponding molecular weights differ by a dicarbonyl molecule, we may assume that ions **2e** result from the reaction of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + hydroimidazolone moiety (ions **1e**) with a dicarbonyl molecule. Therefore, the designation of the protonated molecules of the [(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + hydroimidazolone] + dicarbonyl moieties and corresponding ion structures were attributed to ions **2e**, as presented in Table 4. In order to reinforce the structure attribution of ions **2e**, one dicarbonyl molecule can easily be reacted with the guanidine moiety in the ion structure of ions **1e** (Table 4), which leads to the formation of ions **2e** (Table 4).

Class f (ions **1f** and **2f**)

The ions **1f**, at m/z 247 (2,3-pentanedione) and 275 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), show 123 Da (2,3-pentanedione) and 137 Da (2,3- and 3,4-hexanedione) losses, leading to the formation of m/z 124 (2,3-pentanedione) and 138 (2,3- and 3,4-hexanedione) fragment ions, respectively. These



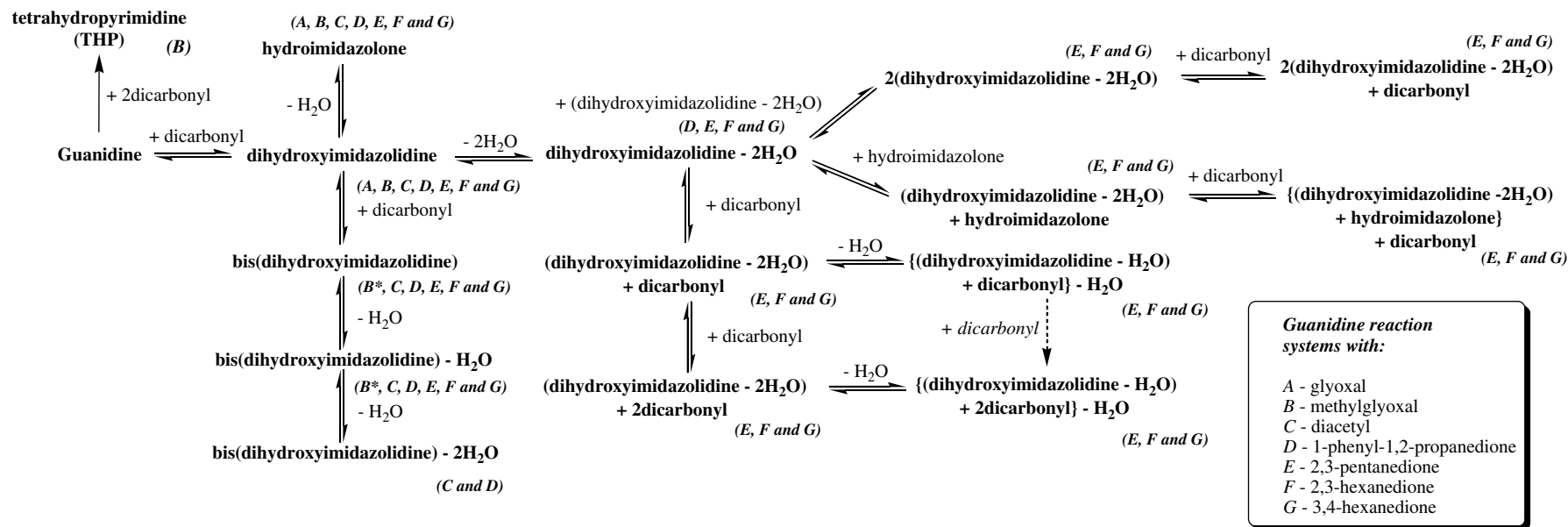
Scheme 4. Fragmentation of the protonated molecules of [(dihydroxyimidazolidine - 2H₂O) + hydroimidazolone] (ion **1e**), proposed for the 2,3-hexanedione reaction system. (Dihydroxyimid - 2H₂O) stands for (dihydroxyimidazolidine - 2H₂O) (ions **3a**). --- and ---- indicate neutral losses. *r* Stands for rearrangement.

two latter ions were found to be ions **3a**, by ESI-MS³ analysis (not shown). Thus the structure of protonated 2(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties was attributed to ions **1f** (Table 4). Moreover, an interesting feature was observed in ions **1f** fragmentation patterns, especially for 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione dicarbonyl reaction systems. In fact, the losses of 97 (C₄H₇N₃), 109 (C₅H₇N₃), and 149 Da (C₆H₇N₅) were common to *m/z* 247 (2,3-pentanedione) and 275 (2,3-hexanedione) (Table 6 – ions **1f**) fragment ion compositions, in particular. For the *m/z* 275 ion (3,4-hexanedione), these losses were 111, 123, and 163 Da, instead. This observation could be rationalized in terms of the fact that for 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione dicarbonyls, 97, 109, and 149 Da losses appear to include the same dicarbonyl substituents, i.e. the methyl group. The mentioned losses, from the precursor *m/z* 247 and 275 ions, were found to lead to the formation of stable substituted triazines as fragment ions, as depicted in Scheme 4. The losses of 97, 109, and 149 Da also appear to result from the same side of the ion structures proposed. Hence, in the formation of ions **1f**, methyl and ethyl/propyl substituents seem to be located at opposite sites of the ion structures (Table 4). In addition, since ions **1e** possess ion structures similar to ions **1f**, we may deduce that the particular structural features of ions **1f** could also be applied to ions **1e**, consistent with ions **1e** fragmentation (Scheme 4). This may be of relative importance, accounting for the relative high abundances observed in the ESI mass spectra for ions **1e** (Table 2).

The ions **2f**, at *m/z* 347 (2,3-pentanedione) and 389 (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 2), showed a more complex fragment ion composition in comparison to the ones previously discussed for the other ions **1a–1f**. In ions **2f** fragment ion composition, prominent losses are one water molecule, 97 Da (C₄H₇N₃, for 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione), 111 Da (C₅H₉N₃, for 3,4-hexanedione), one dicarbonyl molecule, 123 Da (2,3-pentanedione), and 137 Da (2,3- and 3,4-hexanedione) (Table 6). It has also been observed, by means of ESI-MS² experiments, that *m/z* 347 (2,3-pentanedione) and 389 (2,3- and 3,4-hexanedione) lose 123 and 137 Da, respectively, from which the fragment ions at *m/z* 224 (2,3-pentanedione) and 252 (2,3- and 3,4-hexanedione) had resulted. Losses of 123 and 137 Da could be attributed to the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties, and *m/z* 224 (2,3-pentanedione) and 252 (2,3- and 3,4-hexanedione) fragment ions were found to correspond to ions **1d**, by means of ESI-MS³ analysis (not shown). Characteristic losses of one water molecule and one dicarbonyl molecule (Table 6) from *m/z* 224 and 252 ions were also observed in the ESI-MS² spectra of ions **2f**. Ions **2f** may result from the reaction of two (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties (ions **3a**) with a dicarbonyl molecule, similar to what has been postulated for ions **2e**. This assumption seems reasonable, since a dicarbonyl molecule could easily be reacted with the available guanidine moiety in ions **1f**, leading to the formation of ions **2f**. Therefore, the structure of the protonated molecule of the 2(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + dicarbonyl moieties was attributed to ions **2f** (Table 4).

Considerations regarding the reaction products formed

The dicarbonyl reaction systems studied revealed significant differences in their reactivity, summarized in Scheme 5. At least three types of reactivity were observed for the dicarbonyls investigated. The dialdehydic dicarbonyl glyoxal reacts with the amino compound, leading to the formation of the dihydroxyimidazolidine compound, in a higher amount^{27,33} in comparison to the other dicarbonyl reaction systems. The aldehydic dicarbonyl methylglyoxal, when reacted with guanidine, leads to the formation of the stable hydroimidazolone.^{9,27} These results, presented for glyoxal and methylglyoxal reaction systems, are in agreement with the results obtained in other studies in which a blocked arginine has been used.^{9,27,33} The formation of reaction products involving hydrated dicarbonyl forms was observed, in particular, in the formation of THP. Moreover, the formation of argpyrimidine³⁴ was not observed for the methylglyoxal reaction. This seemed quite surprising, since guanidine is itself the reaction center of arginine residues, and the site where argpyrimidine formation has often been observed. It is important to bear that the pK_a of guanidine (13.6, in water) is similar to the pK_a of arginine (12.5, in water). Hence, according to the reaction model proposed by us,²⁷ for the formation of acetyl-hydroimidazolone and acetyl-tetrahydropyrimidine, the formation of argpyrimidine should also be expected to occur in guanidine reactions. To reinforce such an expectation, reasonable amounts of methylglyoxal-derived hydroimidazolone (relative abundance of 20.2%; 1 h) were observed in the ESI mass spectrum. Nevertheless, as previously mentioned in the present study, argpyrimidine formation was not observed. This fact led us to postulate that guanidine, being highly associated in solution (Fig. 3), prevents the formation of the dicarbonyl intermediate involved in argpyrimidine formation. Furthermore, a pyrimidine ring formation was observed for THPs, although the reaction mechanism for the formation of the latter³² is different from the one reported for argpyrimidine.³⁴ In the formation of THP, two mono-hydrated methylglyoxal molecules are individually reacted with two *N* atoms of the guanidino group, from which, by means of an intramolecular rearrangement, the pyrimidine ring results.³² In argpyrimidine formation, one mono-hydrated and one unhydrated methylglyoxal molecule are responsible for the formation of a dicarbonyl intermediate, which will subsequently suffer nucleophilic attack by two *N* atoms of the guanidino moiety of the arginine residues.³⁴ The concentration of methylglyoxal used in this study (100 mM) is much higher than the one observed *in vivo*. Moreover, the concentration of guanidine, equimolar to the methylglyoxal one, does not contribute to a significant protein denaturation.^{35,36} Therefore, we can postulate that guanidine may become an effective inhibitor of argpyrimidine formation *in vivo*. Besides being an inhibitor, guanidine can also act as a dicarbonyl scavenger. It is important to bear that although guanidine is known by its protein denaturant capabilities, the concentration we used (100 mM) should not promote extensive protein modification, according to the literature.^{35,36} It is indeed reported that significant



Scheme 5. Proposed reaction scheme for the reactions of guanidine with the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione. * For the methylglyoxal reaction system, the formation of the bis(dihydroxyimiazolidine) and [bis(dihydroxyimiazolidine) – 2H₂O] occurs as a result of the stabilization of their reaction precursors dihydroxyimiazolidine and hydroimidazolone, respectively, with sodium.

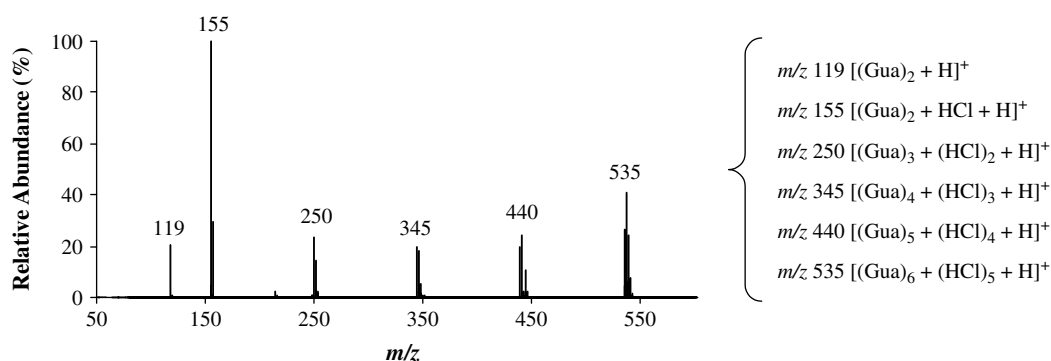


Figure 3. Partial ESI mass spectrum (mass range: m/z 50–600) of an aqueous guanidine solution (1 mM) and corresponding ion attributions. The ion attributions are consistent with the predicted isotopic patterns for those ion compositions. Gua stands for guanidine.

protein modifications usually arise for guanidine concentrations above 2 M.^{35,36}

Moreover, the diketonic dicarbonyls studied revealed, in comparison to glyoxal and methylglyoxal, a distinct reactivity towards guanidine. The formation of dihydroxyimidazolidines and hydroimidazolones was also observed for the diketonic dicarbonyl reactions. For the larger alkyl-diketonic dicarbonyls, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione, in particular, the protonated molecules of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties showed high relative abundances (Table 2). These (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties were found to react with dicarbonyl molecules, with hydroimidazolone moieties, and even with other (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. Moreover, the reaction of guanidine with two dicarbonyl molecules was also observed for the diketonic dicarbonyl reaction systems, in which bis(dihydroxyimidazolidines) molecules were produced. These latter molecules were found to dehydrate (one to two water molecules), leading to the formation of [bis(dihydroimidazolidines) – H₂O] and [bis(dihydroxyimidazolidines) – 2H₂O] moieties. The latter [bis(dihydroxyimidazolidine) – 2H₂O] moieties were only observed for diacetyl and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems. They were not observed for the heavier alkyl-diketonic dicarbonyl reactions, i.e. 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione. A reason for this behavior may be linked to the high amounts of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties formed and also to their high reactivity, which may be responsible for an increased consumption of the available dicarbonyl molecules in solution. This hypothesis seems to be sustained by the high relative abundances observed for the protonated (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) molecules, especially that concerned with the 3,4-hexanedione reaction system (Table 2), in which the consumption of the [bis(dihydroxyimidazolidine) – H₂O] moiety was observed. Moreover, the consumption of the [bis(dihydroxyimidazolidine) – H₂O] moieties was not observed for the other dicarbonyls reaction systems studied in the reaction time course used. With respect to the protonated molecules of bis(dihydroxyimidazolidines), and corresponding dehydrated forms, their relative abundances were found to be higher for the protonated molecules of the singly dehydrated bis(dihydroxyimidazolidine) moieties. An

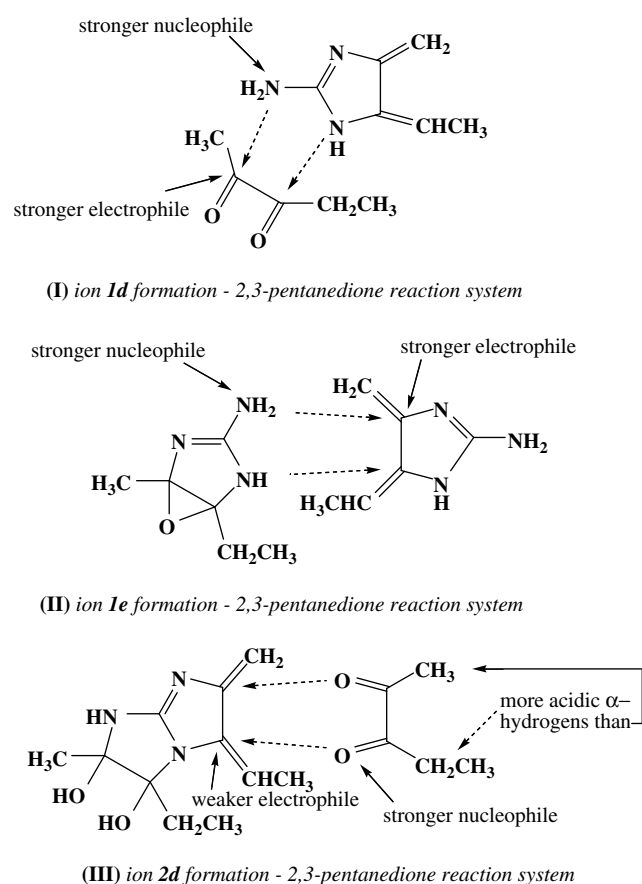
explanation for this can be linked to the high steric hydrance of the reacted dicarbonyl molecules. As mentioned before, (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties react with several forms in solution. Nonetheless, the relative abundances of the ion moieties formed by the reaction of (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties with dicarbonyl molecules (ions **1d–4d**) were found to be negligible. Furthermore, the relative abundances of the ion moieties formed, generated in the reaction of (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties with (hydroimidazolone/dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties (ions **1e** and **1f**), were found to be much higher with respect to the abundances of ions **1d–4d**. Despite the fact that in the time course of the reactions studied the protonated molecules of hydroimidazolone were only barely detected after one day, a reasonable dynamic concentration of hydroimidazolones must exist, stimulated by the increased production of their correspondent dehydrated forms, i.e. (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. Another aspect that deserves mention is the fact that the relative abundances of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + (dicarbonyl/hydroimidazolone/dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties were observed to be much higher for the 3,4-hexanedione reaction system (Table 2). This observation may also be explained by the much higher relative abundances of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties, in comparison to the ones for the other diketonic dicarbonyls (Tables 1 and 2). Although diacetyl and 3,4-hexanedione are, in fact, symmetrical diketonic dicarbonyls, differences in their reactivity were observed when they reacted with the amine compound guanidine. In comparison to the 3,4-hexanedione reaction, the relative abundance of the protonated molecule of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety was very low (Table 3; 1.3% - 1 day), for the diacetyl reaction system. Thus, if steric contributions of the diacetyl molecule led to minimization of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) formation, these effects seem to have the opposite effect on the formation of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety, in the 3,4-hexanedione reaction system in particular. Furthermore, structural features of the ion structures attributed to ions **1d–2f** seem to be of particular interest. As mentioned earlier, the heavier alkyl-substituents of the dicarbonyl 2,3-pentanedione and 2,3-hexanedione dicarbonyl molecules were proposed to be

located at the same side of the imidazole rings, in ions **1f** (Table 4). In fact, in ions **1f**, alkyl-substituents are located at both sides of the imidazole rings formed. In ions **1f**, since the imidazole rings might represent a polar chain, the alkyl-substituents can represent nonpolar ones instead. In addition, the imidazole rings, in ions **1f**, can accommodate other polar groups and become the source of a progressive synthesis. To reinforce this, heavier alkyl groups seem to prefer one of the sides of the imidazole rings, under the present reaction conditions, at least. These structural features that are observed render the ions **1f** structure of particular importance. Nonetheless, despite the fact that these structural features, i.e. heavier alkyl groups being located preferably at one of the imidazole rings' sides, are interesting, they are not very much surprising. When we consider the ion structures attributed to ions **1d**, **1e–2f**, in particular, it can be postulated that the stronger nucleophile will attack the stronger electrophile, i.e. the less alkyl-substituted electrophile, as can be seen, e.g. in ions **1d** and **1e** formation (Scheme 6). This fact led us to conclude that heavier alkyl-substituents, in ions **1d**, **1e–2f**, become preferably located at one of the sides of the imidazole rings. Moreover, the fact that the stronger nucleophile attacks the stronger electrophile cannot be important in the formation of ions **2d** and **4d**. As an illustration, in ions **2d** formation, the stronger nucleophile of the dicarbonyl molecule was proposed to attack the weaker electrophile of the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety, as depicted in Scheme 6. It was also responsible for the maintenance of the larger alkyl-substituents at one of the imidazole ring sides. The nucleophile/electrophile approach, here proposed, can be explained by the more acidic α -hydrogen atoms of the heavier alkyl-substituents of the dicarbonyl molecule. Steric effects, along with electronic ones, can also contribute to this process. Furthermore, despite the fact that ions **1f** possess lower relative abundances in the ESI mass spectra, in comparison to ions **1e** (Table 2), for 2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione reaction systems especially, these latter ions, structurally related to ions **1f** (Table 4), were indeed found to have significant relative abundances in the ESI mass spectra. In addition, ions **1f** were found to have the highest relative abundance in the ESI mass spectra after one day of reaction, for the 2,3-hexanedione reaction. Highest relative abundances were also observed for the same type of ions in 2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione reaction systems (Table 2). If we regard the structures attributed to ions **1e** and **1f**, it can be observed that one guanidine moiety does not react, thus becoming the intact amino function. Since (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties detected in the larger alkyl-diketonic dicarbonyl reaction systems appear to react with dicarbonyl molecules and amino functions, the former moieties can be used to slow down or to inhibit the glycation processes. The (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety can, on the one hand, act as a dicarbonyl scavenger (Table 4 – ions **1d**), and on the other, react fast with amine groups, e.g. the amine functions available in hydroimidazolones (Table 4 – ions **1e**). As it reacts with hydroimidazolones and other reaction products in which dicarbonyls are involved, an unreacted guanidino group can be introduced. This feature might be important because this kind of

polar groups (guanidino) is important in several instances, such as for maintenance of protein stability and function.

CONCLUSIONS

The reactivity of the several dicarbonyl molecules with the amino compound guanidine was found to be different. The differences in reactivity encompass the dialdehydic dicarbonyl glyoxal reactivity, aldehydic dicarbonyl methylglyoxal reactivity, and the diketonic dicarbonyls diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione reactivities. In addition, even within the diketonic dicarbonyls, some differences in their reactivities were observed. The formation of dihydroxyimidazolidine was mainly observed for the glyoxal reaction. Moreover, the formation of a stable hydroimidazolone was observed in the methylglyoxal reaction. In this latter reaction, the formation of the THP, along with its dehydrated form, deserves mentioning. In addition, no argpyrimidine formation was found to occur in this reaction. Thus, the formation of the dicarbonyl intermediate, involved in the formation of argpyrimidine, was prevented by the highly associated amine compound used (guanidine). Therefore, we postulated that guanidine solutions, in sufficiently low concentrations, can be effective in inhibiting the formation of argpyrimidine. The reactivity of the diketonic dicarbonyls, the larger alkyl-diketonic



Scheme 6. Nucleophile/electrophile approach for the formation of ions **1d** (I), **1e** (II), and **2d** (III) – 2,3-pentanedione reaction system.

dicarbonyls, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione, were found to give rise to significant amounts of (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. The latter were found to react with dicarbonyl molecules, hydroimidazolones, and other (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties. The resulting moieties possessed particular ion structures, with a polar chain of imidazole rings and a non-polar one of alkyl groups, the latter being located at both sides of the imidazole rings. In addition, the results obtained in our gas-phase study revealed that the larger alkyl groups seem to be located preferentially at one of the sides of the imidazole rings, for 2(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties in particular. This seems to point to some stereoselectivity of the reaction products formed. Since 2(dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) and (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) + hydroimidazolone moieties, having similar molecular structures, were observed to exist in significant amounts, we may assume that their structural features might be of particular importance. (Dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties, observed in 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, and 3,4-hexanedione reactions, were found to react with dicarbonyl molecules, hydroimidazolones, and other reaction products that involve dicarbonyl molecules. On account of this fact, we may postulate that these (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties can act as dicarbonyl scavengers, as well as react with amine functions, already modified by dicarbonyls, the hydroimidazolones, in particular. For the hydroimidazolones, especially, when the (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moiety reactivity is increased, the reacted (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties introduce an intact guanidino group. This situation can become relevant because the polar groups, such as the guanidino group, are important, for example, for the maintenance of protein stability and function. Moreover, these (dihydroxyimidazolidine – 2H₂O) moieties, and their resulting reacted moieties, seem to be less stable than the triazines formed in the reaction of aminoguanidine (a powerful inhibitor) with the dicarbonyls glyoxal and methylglyoxal, in particular.^{23,24} Therefore, for the control and inhibition of glycation processes, the use of these guanidine derivatives could offer lower levels of toxicity when compared with the use of the aminoguanidine scavenger.

The results obtained in the gas-phase, together with solution considerations, place guanidine as an efficient model compound for studying arginine modifications by dicarbonyls. We believe that the reactions of guanidine with the dicarbonyls under study may also provide some new approaches, in particular, for controlling and inhibiting the glycation processes involving arginine residues.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Doctor Carlos Cordeiro and Professor Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their valuable contribution to this work. Discussions with Professor Susana Santos (CQB-FCUL, Portugal) are also acknowledged. One of the authors, M. Saraiva, is grateful to Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support (SFRH/BD/3162/2000).

REFERENCES

1. Njoroge FG, Monnier VM. The chemistry of the Maillard reaction under physiological conditions: a review. In *The Maillard Reaction and Ageing. Diabetes and Nutrition*, Baynes JW, Monnier VM (eds). AR Liss: New York, 1989; 85.
2. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab. Invest.* 1994; **70**: 138.
3. Munch G, Schinzel R, Loske C, Wong A, Durany N, Li JJ, Vlassara H, Smith MA, Perry G, Riederer P. Alzheimer's disease—synergistic effects of glucose deficit oxidative stress and advanced glycation endproducts. *J. Neural Transm.* 1998; **105**: 439, DOI: 10.1007/S007020050069.
4. Sell DR, Monnier VM. Structural elucidation of senescence cross-link from human extra-cellular matrix: implication of pentoses in the aging process. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 21597.
5. Nakamura K, Hasegawa T, Fukunaga Y, Ienaga K. Crosslines A and B as candidates for the fluorophores in age- and diabetes-related cross-linked proteins, and their diacetates produced by Maillard reaction of α -N-Acetyl-L-lysine with D-glucose. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1992; 992. DOI: 10.1039/C39920000992.
6. Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, Yamaguchi M, Yoshimori K, Fukui M, Fujii M, Kitagawa Y, Nakamura N, Nakamura K, Nakazawa Y, Ienaga K, Ohta M, Nishimura M, Fukui I, Kondo M. Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; **226**: 37, DOI: 10.1006/bbrc.1996.1308.
7. Konishi Y, Hayase F, Kato H. Novel imidazolone compound formed by the advanced Maillard reaction of 3-deoxyglucosone and arginine residues in proteins. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1994; **58**: 1953.
8. Hayase F, Konishi Y, Kato H. Identification of the modified structure of arginine residue in proteins with 3-deoxyglucosone, a Maillard reaction intermediate. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995; **59**: 1407.
9. Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. Binding and modification of proteins by methylglyoxal under physiological conditions. A kinetic and mechanistic study with N_{α} -acetylarginine, N_{α} -acetylcysteine, and N_{α} -acetyllysine, and serum bovine albumin. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
10. Henle T, Walter AW, Haessner R, Klostermeyer H. Detection and identification of a protein-bound imidazolone resulting from the reaction of arginine residues and methylglyoxal. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994; **199**: 55.
11. Schwarzenbolz U, Henle T, Haessner R, Klostermeyer A. On the reaction of glyoxal with proteins. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1997; **205**: 121.
12. Hayase F, Nagaraj RH, Myata S, Njoroge FG, Monnier VM. Aging of proteins: immunological detection of a glucose-derived pyrrole formed during Maillard reaction *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 1989; **264**: 3758.
13. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW. Identification of N_{ϵ} -carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 4889.
14. Rahbar S, Natarajan R, Yerneni KK, Scott S, Gonzales N, Nadler J. Evidence that pioglitazone, metformin and pentoxifylline are inhibitors of glycation. *Clin. Chim. Acta* 2000; **301**: 65, DOI: 10.1016/S0009-8981(00)00327-2.
15. Yan H, Harding JJ. Inactivation and loss of antigenicity of esterase by sugars and steroid. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; **1454**: 183, DOI: 10.1016/S0925-4439(99)00035-6.
16. Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to N_{ϵ} -carboxymethyl-lysine- and N_{ϵ} -(1-carboxyethyl)lysine-modified albumin. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
17. Akagawa M, Sasaki T, Suyama K. Oxidative deamination of lysine residue in plasma protein of diabetic rats. Novel mechanism via the Maillard reaction. *Eur. J. Biochem.* 2002; **269**: 5451, DOI: 10.1046/j.1432-1033.2002.03243.x.
18. Khalifah RG, Baynes JW, Hudson BG. Breakthroughs and views. Amadorins: novel post-amadori inhibitors of advanced glycation

- end products. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; **257**: 251, DOI: 10.1006/bbrc.1999.0371.
19. Mišur I, Turk Z. Substituted guanidine compounds as inhibitors of nonenzymatic glycation *in vitro*. *Croat. Chem. Acta.* 2001; **74**: 455.
 20. Rahbar S, Figarola JL. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (AGEs): a review. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 63, DOI: 10.1016/j.abb.2003.08.009.
 21. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking. *Science* 1986; **232**: 1629.
 22. Wiernsperger N, Rapin JR. Metformin-insulin interactions: from organ to cell. *Diabetes Metab. Rev.* 1995; **11**: S3.
 23. Monnier V. Intervention against the Maillard reaction *in vivo*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 1, DOI: 10.1016/j.abb.2003.08.014.
 24. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 31, DOI: 10.1016/j.abb.2003.08.013.
 25. Vasan S, Zhang X, Kapurniotu A, Bernhagen J, Teichberg S, Basgen J, Wagle D, Shilh D, Terlecky I, Bucala R, Cerami A, Egan J, Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks *in vitro* and *in vivo*. *Nature* 1996; **382**: 275, DOI: 10.1038/382275a0.
 26. Thornalley PJ, Minhas HS. Rapid hydrolysis and slow α,β -dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links. *Biochem. Pharmacol.* 1999; **57**: 303, DOI: 10.1016/S0006-2952(98)00284-6.
 27. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. Non-enzymatic model glycation reactions—a comprehensive study of the reactivity of a modified arginine with aldehydic and diketonic dicarbonyl compounds by electrospray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 755, DOI: 10.1002/jms.1031.
 28. Schug K, Lindner W. Using electrospray ionization-mass spectrometry/tandem mass spectrometry and small molecules to study guanidinium-anion interactions. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **241**: 11, DOI: 10.1016/j.ijms.2004.10.019.
 29. Schug K, Lindner W. Development of a screening techniques for noncovalent complex formation between guanidinium- and phosphonate-functionalized amino acids by electrospray ionization ion trap mass spectrometry: assessing ionization and functional group interaction. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004; **235**: 213, DOI: 10.1016/j.ijms.2004.04.012.
 30. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. Reactions of a modified lysine with aldehydic and ketonic dicarbonyl compounds: an electrospray mass spectrometry structure/activity study. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 216, DOI: 10.1002/jms.980.
 31. Martins SIFS. Unravelling the Maillard reaction network by multiresponse kinetic modelling. Ph.D. Thesis, Wageningen University, The Netherlands, 2003.
 32. Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
 33. Glomb M, Lang G. Isolation and characterization of glyoxal-arginine modifications. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493, DOI: 10.1021/jf001082d.
 34. Al-Abed Y, Misuhashi T, Ulrich P, Bucala R. Novel modifications of N^α-BOC-arginine and N^α-CBZ-lysine by methylglyoxal. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1996; **6**: 1577, DOI: 10.1016/S0960-894x(96)00276-4.
 35. DeKoster GT, Robertson AD. Calorimetrically-derived parameters for protein interaction with urea and guanidine-HCl are not consistent with denaturant *m* values. *Biophys. Chem.* 1997; **64**: 59, DOI: 10.1016/S0301-4622(96)02219-3.
 36. Baynes BM, Wang DIC, Trout BL. Role of arginine in the stabilization of proteins against aggregation. *Biochemistry* 2005; **44**: 4919, DOI: 10.1021/bi047528r.

8.2. Conclusões.

Nas misturas reaccionais da guanidina com os α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos seleccionados, foram identificados variadíssimos iões de interesse, ao nível do espectro de massa ESI, sendo estes iões caracterizados por recurso à espectrometria de massa *tandem* MSⁿ. Os iões de interesse identificados nas misturas reaccionais da guanidina, por aplicações de técnicas de espectrometria de massa ESI, foram agrupados em 6 classes com base nas estruturas dos produtos de reacção formados. Ao nível das experiências MSⁿ realizadas, verificou-se que a fragmentação de iões de interesse, detectados nos espectros de massa ESI, é de variadíssima ordem. Contudo, na fragmentação de iões precursores não desidratados observou-se a libertação de neutros relativos às moléculas de reagentes e de produtos de reacção que se formaram. Na fragmentação de iões precursores desidratados, observou-se uma intensificação da fragmentação dos anéis formados no centro amina reagido (guanidina), com um especial relevo para a fragmentação de formas de iões precursores mais desidratadas, em que os iões fragmento formados incluíam nomeadamente uma parte dos substituintes alquilo, provenientes das moléculas de dicarbonilo iniciais, com uma parte do anel formado, no centro amina. Para a fragmentação de iões precursores relativos às moléculas protonadas de formas moleculares mais condensadas, resultantes das condensações de dihidroxiimidazolidina e de dihidroxiimidazolidina – 2H₂O com espécies de vária ordem, verificou-se sobretudo a perda de moléculas de reagentes e de unidades discretas das condensações ocorridas. Na verdade, os perfis de fragmentação para as moléculas protonadas dos produtos de reacção da guanidina são de algum modo distintos dos perfis de fragmentação determinados para as moléculas protonadas dos produtos de reacção da acetil-arginina, acentuado-se esta diferença sobretudo no que respeita à fragmentação de moléculas protonadas de iões precursores mais desidratados. Esta situação era de esperar uma vez que na fragmentação das moléculas protonadas de produtos de reacção, detectados nas reacções da acetil-arginina, com agregados relativamente estáveis, ao nível do grupo arginil, a fragmentação ao nível do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina é favorecida, contrariamente ao que se verifica na fragmentação das moléculas protonadas de produtos de reacção, identificados nas reacções da guanidina, em que é inevitável a fragmentação dos agregados formados no centro amina, por mais estáveis que estes possam ser.

Nas reacções da guanidina com os α -dicarbonilos seleccionados, verificaram-se diferentes tipos de reactividade, para os dicarbonilos aldeídicos em particular e para os

dicarbonilos dicetónicos. Mesmo dentro dos conjuntos de dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos se verificaram diferentes tipos de reactividade. Para o dicarbonilo glicoxal, observou-se uma formação significativa do composto dihidroxiimidazolidina, ao passo que para o dicarbonilo metilglicoxal a respectiva reacção evoluiu para a formação do composto hidroimidazolona estável. Estes resultados são concordantes com os observados para as reacções da acetil-arginina [1–4]. Ainda na reacção da guanidina com metilglicoxal, observou-se a formação do composto tetrahidropirimidina, e correspondente forma mono-desidratada, e surpreendentemente não foi observada a formação do composto argpirimidina. Este último resultado é, sem dúvida, interessante, na medida em que a formação do composto argpirimidina [5] foi observada de um modo significativo para a reacção da acetil-arginina com metilglicoxal [4]. Como tentativa de explicação desta ocorrência, pensa-se que as soluções de guanidina podem prevenir a formação do composto argpirimidina, uma vez que a guanidina é um composto francamente associado em solução aquosa, podendo, deste modo, inviabilizar a formação do intermediário envolvido na formação do composto argpirimidina. Este intermediário compreende, na sua formação, a reacção de uma molécula de metilglicoxal não-hidratada com uma molécula de metilglicoxal mono-hidratada. A ausência da formação do referido intermediário [6] pode assim ficar a dever-se a uma perturbação na reacção entre estas duas formas de metilglicoxal mencionadas. Como as concentrações de guanidina usadas nas misturas reaccionais são suficientemente baixas (i.e. 100 mM) para prevenir a desnaturação de proteínas [7,8], é bem possível que os resultados obtidos possam ser adequados para os sistemas de moléculas biológicas, como as proteínas, já que a desnaturação das mesmas, dada a presença de guanidina, ocorre usualmente para concentrações de guanidina superiores a 2 M [7,8]. No segundo estudo apresentado, no capítulo anterior, discutiu-se a importância da influência de considerações energéticas e estéricas do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina na estabilidade dos anéis de imidazolidina formados, ao nível da estrutura dos compostos pertencentes à classe de compostos de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), para as reacções da acetil-arginina com α -dicarbonilos dicetónicos, incluindo 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona. Em função da influência proporcionada pelo resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina, verificou-se, também no estudo anterior, que o processo de desidratação a uma molécula de água, nos anéis de imidazolidina formados, na estrutura do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), se mostrava selectivo, face às reacções dos dicarbonilos

mais simétricos (2,3-pentanodiona e 3,4-hexanodiona) e mais assimétricos (1-fenil-1,2-propanodiona e 2,3-hexanodiona), o que poderá dever-se à atribuição de duas estruturas distintas para os compostos mono-desidratados de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), no que respeita aos sistemas dos dicarbonilos mais simétricos e mais assimétricos referidos. No presente estudo, e em relação à reacção da guanidina com o mesmo conjunto de α -dicarbonilos dicetónicos mencionados, verificou-se, ao nível das propostas de estrutura para os produtos de reacção, pertencentes à classe de compostos de bis(dihidroxiimidazolidina), que não foram distinguidas duas estruturas, no que se refere às reacções dos dicarbonilos mais simétricos e mais assimétricos acima referidos. Neste sentido, é possível enunciar que o resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina pode ser responsável pela selectividade de determinados processos reaccionais ocorridos, para estabilização dos agregados formados no grupo arginil, na estrutura dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), uma vez que no caso das correspondentes reacções para a guanidina a influência discriminada é cancelada, o que se explica pelo facto da molécula de guanidina ser apenas representativa do grupo arginil, e não do resíduo da acetil-arginina.

Como se referiu anteriormente, existem diferenças significativas de reactividade dentro dos sistemas de reacções dos dicarbonilos dicetónicos, em particular entre os dicarbonilos diacetil e 1-fenil-1,2-propanodiona, e os restantes dicarbonilos de maior cadeia alquílica, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona. Esta diferença na reactividade das formas de dicarbonilo dicetónicas pode facilmente ser compreendida pela formação significativa do composto dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, para as três formas de dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica mencionados, em particular. O composto dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ identificado, em especial, para os sistemas reaccionais dos dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica, conduziu à formação de produtos de reacção mais condensados, por reacção com moléculas de dicarbonilo existentes, compostos hidroimidazolona e formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$. Esta situação pode ser entendida dada a natureza conjugada das formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, o que reforça o facto das entidades condensadas deste composto serem produtos de reacção e não espécies que hajam sido formadas através do estabelecimento de interacções não covalentes. Curiosamente, verificou-se nas propostas estabelecidas para as formas condensadas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, que os substituintes alquilo de maior tamanho se encontravam localizados num dos lados dos anéis de imidazolo formados, no centro reactivo guanidina. Contudo, em

ambos os lados das sequências de anéis de imidazolo formados, nas formas condensadas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, dispõem-se grupos alquilo, provenientes das formas de dicarbonilo que reagiram. Tendo em consideração o facto de grupos alquilo de maiores dimensões se localizarem preferencialmente num dos lados dos anéis de imidazolo formados, é possível assumir que existe alguma estereoselectividade na formação das formas condensadas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$. Com a constatação de que a formação das entidades condensadas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, em particular de 2(dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$) e de (dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$) + hidroimidazolona, fora significativa, por exemplo em comparação com a formação dos produtos observados na reacção das formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ com moléculas de dicarbonilo, é possível destacar a selectividade dos compostos de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ para com alguns produtos de reacção formados, como os compostos de hidroimidazolidina, a associar ao facto de neste tipo de processos ter sido constatada a introdução de um grupo guanidina intacto, nas estruturas das correspondentes formas condensadas. Esta situação pode ser particularmente vantajosa no contorno das modificações ocorridas em proteínas, dada a introdução de um grupo guanidina intacto, uma vez que grupos polares, como os grupos guanidina, têm um papel de relevo na estabilização hidrofóbica de proteínas, para além de serem responsáveis pela manutenção de aspectos de estabilidade e de interacção/reactividade local nas proteínas. Face ao exposto, torna-se sugestivo atribuir um papel de destaque às formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, como possíveis captadores de formas de dicarbonilo e de outras formas reactivas, mesmo tratando-se, estas últimas, de formas homólogas, produzidas nas reacções dos resíduos de arginina com dicarbonilos. Torna-se, por conseguinte, possível transportar a importância das formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ para o contexto do controlo e da inibição da glicação. Considerando os resultados obtidos, destaca-se ainda a importância da reactividade da guanidina como modelo reaccional para interpretação das modificações dos resíduos de arginina nas proteínas pelos compostos α -dicarbonilo.

Sumariamente, as reacções da guanidina com os dicarbonilos seleccionados, os dicarbonilos glicoxal e metilglicoxal, em particular, revelaram ser semelhantes às reacções da acetil-arginina, em termos dos produtos de reacção formados e dos aspectos da sua cinética, como se pode constatar no primeiro dos dois estudos apresentados, no capítulo anterior. Esta semelhança reaccional, para a reacção da acetil-arginina, fora, na verdade, observada para a extensão do conjunto de dicarbonilos estudados nos sistemas

reaccionais da guanidina. Verificou-se, também, que as soluções da guanidina podem prevenir a formação do composto argpirimidina, o que constitui um resultado de todo inesperado no contexto da reactividade do centro reactivo guanidina. A formação de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, nas reacções da guanidina com os dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica, conduziu à formação de formas condensadas do composto, possuindo, estas últimas formas, estruturas peculiares, em que os substituintes alquilo de maior dimensão se encontram localizados num dos lados das sequências de anéis de imidazolo produzidas. Estas sequências de anéis de imidazolo produzidas, podem ainda ser estimuladas, possivelmente talvez até à formação de estruturas progressivamente mais condensadas e altamente organizadas, segundo condições reaccionais apropriadas, e tendo em conta que grupos alquilo de maiores dimensões se podem encontrar localizados nas estruturas desenvolvidas, pelo que pode existir uma franca aplicabilidade e versatilidade para o seu uso. Para além dos aspectos estruturais interessantes das entidades condensadas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$, parece existir também alguma relevância para a reactividade das formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ precursoras, uma vez que podem reagir com formas de dicarbonilo, hidroimidazolona e com outras entidades homólogas, resultando, em termos das estruturas das formas condensadas formadas, na introdução de um grupo guanidina intacto, em especial na reacção das formas de dihidroxiimidazolidina – $2\text{H}_2\text{O}$ com as duas últimas espécies moleculares referidas, podendo este aspecto ser extremamente vantajoso no contexto do controlo e da inibição dos processos de glicação.

Interessa salientar que na reacção da acetil-arginina com as formas de dicarbonilo de maior cadeia alquílica, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona, os resultados obtidos (ver Anexo), na análise ESI-MS, são bastante similares aos descritos neste estudo, para a reacção da guanidina com o mesmo conjunto de dicarbonilos dicetónicos.

No contexto da reactividade do grupo guanidina tem existido um interesse particular por parte de investigadores, na interpretação das modificações ocorridas ao nível dos resíduos de arginina em moléculas biológicas, como as proteínas. Não só isto acontece no contexto da glicação, mas também noutros contextos, como o abordado no estudo anterior, relativo à modificação de resíduos de arginina em proteínas e em enzimas por acção de α -dicarbonilos dicetónicos, com o intuito de se modificar resíduos de arginina, localizados ao nível do centro activo de enzimas, em particular, para assim

se poderem estudar os aspectos da sua actividade nas biomoléculas. Não é só apenas importante a elucidação dos aspectos da reactividade dos resíduos arginina, uma vez que estes resíduos, ao constituírem grupos extremamente polares e importantes para a estabilidade das biomoléculas, têm sido reconhecidos como extremamente valiosos para a optimização de uma detecção eficaz de proteínas, por exemplo no contexto da aplicabilidade das técnicas de espectrometria de massa, como ESI-MS e MALDI [9]. Nesta base, é possível enunciar o desenvolvimento de métodos de derivatização, responsáveis pela conversão de resíduos de lisina em resíduos de homoarginina, por reacção dos primeiros resíduos com *o*-metilureia [9,10]. Assim, a conversão dos resíduos de lisina em proteínas, ou em moléculas de menor dimensão, como os correspondentes péptidos resultantes da digestão de proteínas, em resíduos de homoarginina, e em conjunto com os resíduos de arginina nativos, resulta num aumento da detecção das biomoléculas quando da aplicação de técnicas de espectrometria de massa de electrospray e MALDI, tendo até mesmo efeitos vantajosos para aplicação da espectrometria de massa *tandem* (MS-MS) [9–12].

Para além dos aspectos da reactividade do grupo arginil, na estrutura dos resíduos de arginina, tem-se verificado que o grupo arginil é capaz de induzir a formação de estruturas não covalentes estáveis, com espécies portadoras de grupos aniónicos [13]. Neste contexto, os resíduos de arginina têm sido reconhecidos como mediadores para o estabelecimento de inúmeros complexos não covalentes biológicos, incluindo proteína-metal, proteína-proteína, proteína-péptido, e proteína-oligonucleótido [13,14]. Tendo em atenção que os crescentes esforços envidados, para a compreensão dos processos celulares ao nível molecular, têm indiscutivelmente beneficiado da informação obtida ao nível do estudo das interações não covalentes, o papel dos resíduos arginina, no contexto referido acima, pode ter um destaque particular, podendo mesmo ser susceptível de grandes desenvolvimentos num futuro próximo. Na tentativa de elucidação da funcionalidade do grupo arginil, no contexto da química não covalente de biomoléculas, tem-se constatado, ao nível da literatura, um acréscimo de trabalhos respeitantes ao estudo de interacções não covalentes estabelecidas entre moléculas de baixa massa molecular contendo grupos guanidina, como a própria guanidina, e derivados de vária ordem, e o aminoácido arginina e formas homólogas, com biomoléculas, como proteínas e DNA [15–18].

8.3. Bibliografia.

- [1] Glomb M, Lang G. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493.
- [2] Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
- [3] Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
- [4] Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass. Spectrom.* 2006; **41**: 755.
- [5] Al-Abed Y, Misuhashi T, Ulrich P, Bucala R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1996; **6**: 1577.
- [6] Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **344**: 29.
- [7] DeKoster GT, Robertson AD. *Biophys. Chem.* 1997; **64**: 59.
- [8] Baynes BM, Wang DIC, Trout BL. *Biochemistry.* 2005; **44**: 4919.
- [9] Warwood S, Mohammed S, Cristea IM, Evans C, Whetton AD, Gaskell SJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; **20**: 3245.
- [10] Brancia FL, Oliver SG, Gaskell SJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; **14**: 207.
- [11] Hale JE, Butler JP, Knierman MD, Becker GW. *Anal. Biochem.* 2000; **287**: 110.
- [12] Beardsley RL, Karty JA, Reilly. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000; **14**: 2147.
- [13] Calnan BJ, Tidor B, Biancalana S, Hudson D, Frankel AD. *Science.* 1991; **252**: 1167.
- [14] Brooks H, Lebleu B, Vives E. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2005; **57**: 559.
- [15] Schug K, Lindner W. *Int. J. Mass Spectrom.* 2004; **235**: 213.
- [16] Schug K, Lindner W. *Int. J. Mass. Spectrom.* 2005; **241**: 11.
- [17] Schug KA, Lindner W. *Chem. Rev.* 2005; **105**: 67.
- [18] Ohara K, Smietana M, Vasseur J-J. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2006; **17**: 283.

9. Reacções da aminoguanidina com α -dicarbonilos.

Nos capítulos anteriores apresentaram-se estudos relacionados com a reactividade de aminoácidos básicos modificados, acetil-lisina e acetil-arginina, e de um composto homólogo ao grupo arginil da acetil-arginina (guanidina), com compostos de α -dicarbonilo aldeídicos e dicetónicos. Como se referira no capítulo anterior, tem existido alguma relevância para o estudo da interacção/reactividade dos resíduos de arginina, no âmbito dos sistemas das moléculas biológicas, como as proteínas, e não só tal parece acontecer de um ponto de vista de interpretação dos aspectos estruturais e da funcionalidade das proteínas [1], como também de um ponto de vista analítico [2], para optimização da análise de moléculas biológicas por aplicação de técnicas de espectrometria de massa. Aliás, um importante acréscimo do conhecimento do comportamento dos processos celulares ao nível molecular tem sido proporcionado por recurso a técnicas de espectrometria de massa, em particular de electrospray [3–7] e de MALDI [8]; as técnicas de ESI-MS e MALDI têm sido alvo de modificações instrumentais [9], de modo a se poderem compatibilizar com os sistemas de macromoléculas e de complexos de moléculas associados de elevada ordem. Assim, tendo em consideração a importância dos aspectos da interacção/reactividade dos resíduos arginina, quer ao nível da modificação das proteínas quer de um ponto de vista analítico, optou-se por investigar a reacção de um derivado da guanidina, o composto aminoguanidina, com o mesmo conjunto de α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos. Relativamente ao estudo apresentado no capítulo anterior, para a reactividade da guanidina, constatou-se que as influências energéticas e estéricas proporcionadas pelos resíduos do aminoácido modificado acetil-arginina se apresentavam canceladas na reactividade da guanidina, o que era de esperar, pois a guanidina é apenas representativa do grupo arginil da acetil-arginina. Deste modo, e tendo em conta que na reactividade da guanidina fora de algum modo elucidada a contribuição dos efeitos energéticos dos electrófilos, provenientes da moléculas de dicarbonilo reagidas, com a natureza e aspectos mecanísticos dos produtos de reacção formados, um estudo da reactividade da aminoguanidina pode ser bastante útil para o desenvolvimento da investigação da reactividade dos centros reactivos guanidina derivados, com os compostos α -dicarbonilo seleccionados, sobretudo quando se sabe que formas bastante desidratadas de alguns produtos de reacção formados, como os compostos de aminotriazina [10], nas reacções

da aminoguanidina, são relativamente estáveis, tendo como tal uma reactividade muito distinta dos compostos de dihidroxiimidazolidina formados, nas reacções da guanidina. A situação anterior poderá ser bastante valiosa para um acréscimo de informação relativamente à reactividade dos centros guanidina e guanidina derivados, na medida em que para centros reactivos guanidina derivados, como a aminoguanidina, a formação de espécies mais desidratadas de alguns produtos de reacção inicialmente formados, se pode enquadrar numa de duas situações distintas, em comparação com a reactividade da guanidina. Na primeira situação, os produtos de reacção podem evoluir para a formação de outros produtos de reacção mais estáveis, embora à partida a formação destes produtos mais estáveis esteja relacionada com a compensação de determinados processos reaccionais, como é caso das consecutivas desidratações dos compostos de dihidroxiimidazolidina nas reacções da guanidina. Querendo dizer com isto que para as formas mais desidratadas dos compostos de dihidroxiimidazolidina, e.g. dihidroxiimidazolidina – 2H₂O, a sua formação pode, em boa medida, estar condicionada pela equivalência energética e estabilidade dos centros electrófilos das moléculas de dicarbonilo reagidas, a qual parece ser de algum modo preservada (equivalência energética), mesmo na reacção da guanidina com os dicarbonilos mais assimétricos. Na segunda situação tem-se a evolução da formação de espécies desidratadas mais estáveis, sem que haja compensação de processos reaccionais específicos, o que parece ser o caso das reacções da aminoguanidina. Deste modo, torna-se importante destacar o papel das considerações energéticas dos centros electrófilos das moléculas de dicarbonilo que reagiram, na estabilidade e reactividade dos produtos de reacção formados, o que reforça a opção de se estudar as reacções da aminoguanidina com o mesmo conjunto de α -dicarbonilos, estudados nas reacções da guanidina.

No contexto da glicação, ou melhor no contexto do controlo e da inibição da glicação, o composto de aminoguanidina é bem reconhecido, devido à sua capacidade de reagir prontamente com formas de α -dicarbonilo, de um modo mais rápido que os resíduos de aminoácidos básicos das proteínas [10]. Com efeito, o composto de aminoguanidina tem sido exaustivamente estudado, sendo muito seguramente um dos compostos inibidores carbonílicos mais investigados no contexto do controlo e da inibição da glicação [11,12]. Tendo em atenção a selectividade das reacções da aminoguanidina para com formas de α -dicarbonilo, torna-se também proveitoso, no presente estudo, verificar se existe alguma influência particular, nos processos de

reacção da aminoguanidina com um conjunto de α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos seleccionados, e também investigar qual a contribuição da energética dos centros electrofílicos nas moléculas de dicarbonilo reagidas, para a formação dos produtos de reacção.

9.1. Objectivos.

O presente estudo ocupa-se da investigação das reacções dos compostos de aminoguanidina com os compostos α -dicarbonilo aldeídicos (glioxal e metilglioxal) e dicetónicos (diacetil, 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona), por recurso a técnicas de espectrometria de massa de electrospray. Em semelhança com o que foi discutido anteriormente, e com os sistemas reaccionais abordados nos capítulos anteriores, com este estudo pretende-se (i) identificar e caracterizar os iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, (ii) comparar as propostas estruturais para os produtos de reacção, identificados nas reacções da guanidina e da aminoguanidina, em particular, (iii) utilizar alguma informação espectral para os iões de interesse detectados, no sentido de se obter alguma informação sobre o comportamento cinético dos produtos de reacção formados, (iv) propor um mecanismo para a reacção da aminoguanidina; também assistido pela investigação dos efeitos energéticos dos centros electrofílicos das moléculas de dicarbonilo reagidas, na reactividade da aminoguanidina, (v) interpretar o mecanismo proposto para a reacção da aminoguanidina, no contexto do controlo e da inibição dos processos de glicação, com um ênfase especial no contexto da captação das formas de dicarbonilo.

Reactions of aminoguanidine with α -dicarbonyl compounds. An electrospray ionization mass spectrometry based study.¹

ABSTRACT

Aminoguanidine possesses extensive pharmacological properties. This drug is recognized as a powerful α -dicarbonyl scavenger. In order to better elucidate the reactivity of aminoguanidine with α -dicarbonyls, aminoguanidine was reacted with several aldehydic and diketonic α -dicarbonyls. Electrospray ionization mass spectrometry is a suitable technique to study chemical and biochemical processes, and was selected for the purpose. In aminoguanidine reactions, triazines were detected and, other compounds that have never been reported before were identified. Triazine precursor forms were detected, namely tetrahydrotriazines and singly dehydrated tetrahydrotriazines. Besides the formation of these latter cyclic structures, the formation of non-cyclic structures (hydrazones), all leading to triazines formation, was also discussed in this study. The formation of hydrazones accounts for the regioselective nature of aminoguanidine reactions with α -dicarbonyls, particularly when the reacted dicarbonyl molecules possess electrophiles with very different energetics. Gas phase results suggest that for methylglyoxal and 1-phenyl-1,2-propanedione systems, in particular, the formation of hydrazones could result, consistent with literature data. These two dicarbonyl reaction systems are compared with the remaining dicarbonyl systems investigated, concerning the formation of isomeric triazines. Moreover, species with bicyclic ring structures, and dehydrated forms, were also identified in aminoguanidine reactions. These species appear to result from tetrahydrotriazines and

¹ Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* (submetido).

triazines reactions with one dicarbonyl molecule. Experiments revealed that these bicyclic species, in particular the ones resulting from triazines reactivity, could exist in solution, since they were both identified in the reactions of aminoguanidine and of a selected triazine with the dicarbonyls studied. The results obtained, regarding aminoguanidine/triazines reactivities, appear to support the capability of triazines to condensate and form polycyclic ring structures, and also to support literature mechanistic data for dihydroimidazotriazines formation via dihydroxyimidazolidine-triazines.

The data obtained in this study may prove to be valuable to complement solution information, concerning the reactivity of amines with α -dicarbonyls, in particular.

KEYWORDS: aminoguanidine; α -dicarbonyls; electrospray ionization mass spectrometry; aminotriazines; hydrazones.

INTRODUCTION

The importance of the use of aminoguanidine in physiology and pharmacology has been widely recognized.¹⁻⁵ Aminoguanidine, a nucleophilic hydrazine compound, contains a terminal amino group, with chemical reactivity higher than the one of proteins terminal amino groups.⁵ Aminoguanidine has thus been considered to be an effective compound for trapping reactive carbonyl intermediates. In addition, aminoguanidine has been extensively used in the control and inhibition of glycation processes.¹⁻⁵ Furthermore, the basic guanidinium functional group is commonly used by proteins and enzymes as an essential recognition unit or catalytic moiety.⁶ Aminoguanidine⁷ is a drug known to possess extensive pharmacological properties, serving also as an important starting material for the synthesis of drugs and enzyme inhibitors.⁶ Moreover, aminoguanidine has been shown to possess pro-oxidant activity *in vitro*.⁸⁻¹⁰ Aminoguanidine is also able to generate hydrogen peroxide⁸ and superoxide anions,¹¹ to have chelating activity¹² and to inactivate nitric oxide synthase and semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO).⁶

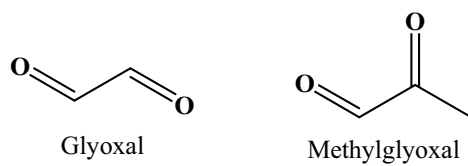
Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) rapidly became a major analytical technique in many branches of science and the number of ESI-MS applications is still growing steadily.^{13,14} A novel and a well succeeded application of ESI-MS concerns the study of reaction mechanisms in solution.^{13,14} The success of the technique relies on the ability of ESI to rapidly and efficiently “fish” reactants, intermediates and reaction products in ionic forms (regardless of their nature) directly from solution to the diluted gas phase environment of mass spectrometers, allowing the species to be identified and characterized by means of *tandem* mass spectrometry (MSⁿ).^{13,14} The term ESI-MS “ion fishing” has been recently coined, and the first review describing this aspect has been published recently, approaching general concepts,

advantages and applications of on-line and off-line screening.¹³ Eberlin and co-workers reported a detailed overview of several important chemical reactions, accomplished via gas phase ion interception, characterization and reactivity investigation of its key players.^{13,14} In a previous study,¹⁵ the solutions of six analytes (analytes with different acid/base chemistry) were investigated under ESI-MS conditions, in the presence of the HEPES buffer. The referred study might be regarded as an extension of the ESI-MS ion fishing methodology.^{13,14} The effect of solution parameters, such as analyte and HEPES buffer (electrolyte) concentrations, solution pH, and analyte acid/base chemistry (pK_a), on ESI-MS ion response, was investigated in that study.¹⁵ One of the analytes investigated was the triazine, 3-amino-1,2,4-triazine, identified in the reaction of aminoguanidine with glyoxal.^{16,17} For triazine solutions with a 10^{-3} M HEPES buffer, and similarly to the other analytes selected, the analyte ESI mass spectra ion responses varied linearly with their corresponding concentrations in solution, particularly for analyte concentrations in solution above 10^{-5} M (i.e. generally in the average analyte concentration range: 5×10^{-3} M – 10^{-5} / 10^{-6} M).¹⁵ Although high amounts of a non-volatile buffer, such as HEPES, were used, in the analyte solutions to be electrosprayed, no significant analyte ion signal suppression was observed. In fact, electrospraying these analyte solutions appeared to improve the ionization of analytes, especially for high analyte concentrations in solution.¹⁵ These results are consistent with the ones obtained by Constantopoulos et al.,¹⁸ regarding the presence of important amounts of electrolyte species in the analyte solutions and analyte ion ESI response enhancement, throughout the application of the partitioning equilibrium model. It is important to refer that the results obtained in our previous study concern the investigation of two components solutions (analyte + HEPES buffer). By using reasonably high amounts of HEPES buffer in the analyte solutions to be electrosprayed,¹⁵ we observed several

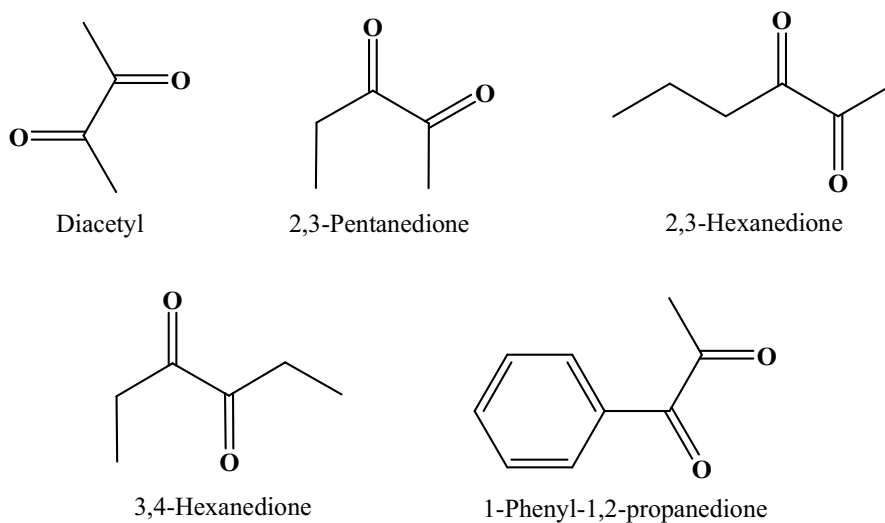
advantages: (i) stabilization of solution pH – important for biological analytes studies, (ii) enhancement of analytes ESI ion signals, (iii) development of a relation between solution and gas phase (ESI-MS) behaviours, particularly for analyte concentrations in the following range $10^{-5} - 10^{-3}$ M.

At solution physiological pH aminoguanidine exists in the protonated form and reactant and reaction product molecules (formed in the reaction of aminoguanidine with α -dicarbonyls), can be easily protonated and successfully transferred as isolated species to the gas phase. With the above mentioned methodology in mind, we decided to use electrospray ionization mass spectrometry and its *tandem* mass spectrometry version to identify and characterize reactant and reaction products and to monitor the reactions of aminoguanidine with aldehydic and diketonic α -dicarbonyl compounds (Fig. 1). This study aims to better elucidate aminoguanidine reaction mechanistics and also to explore how the dicarbonyl functionality affects aminoguanidine reactions and reaction products formation.

Aldehydic α -dicarbonyls



Diketonic α -dicarbonyls



Amines

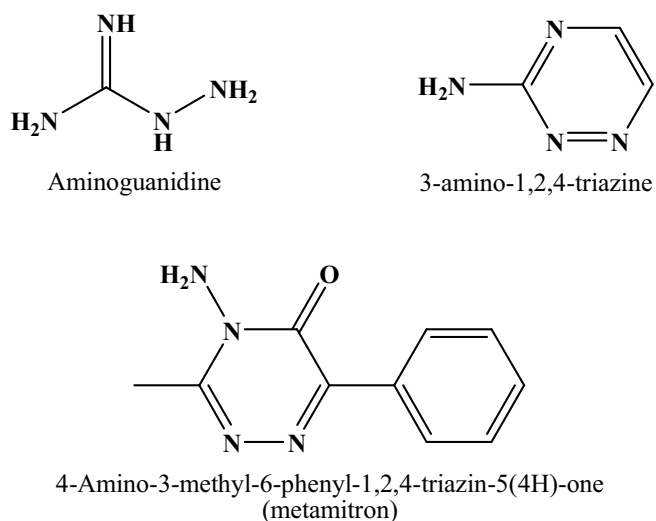


Figure 1. α -Dicarbonyls and amine compounds chemical structures.

EXPERIMENTAL

Materials and Methods

Materials

The amino compound aminoguanidine hydrochloride, the dicarbonyls glyoxal, diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione, 3,4-hexanedione, the sulfonic buffer 4-(-2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid sodium salt (HEPES sodium salt), the methylglyoxal dicarbonyl precursor methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal, and the triazine 3-amino-1,2,4-triazine, were purchased from Sigma Chemical. The organic solvent methanol (HPLC p.a.) was from Merck. Ultrapure deionised water (18.2 M Ω .ms), generated in a Milli-Q plus system, was also used in the preparation of the reaction mixtures. Concentrated solutions of sodium hydroxide (NaOH) (solid pellets from Merck) and hydrochloric acid (HCl) (Riedel-de Haën) were used in order to adjust media pH. All chemicals used were of the highest quality available.

Chemical synthesis of methylglyoxal

In order to avoid some of the main contaminants existing in the commercially methylglyoxal stock solutions available, methylglyoxal was synthesised via methylglyoxal 1,1'-dimethylacetal acid hydrolysis (methylglyoxal yield *ca.* 50 %, as described in a previous report).¹⁹

Preparation and incubation of the reaction mixtures

In the aminoguanidine reaction mixtures preparation, both the aminoguanidine and the dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione solutions (200 mM) were prepared

by dissolving the compounds individually in a previously prepared HEPES buffer solution (400 mM). These solutions pH was then adjusted to 7.5. Subsequently, 1.5 mL of the buffered aminoguanidine solution was added to 1.5 mL of the dicarbonyl buffered solution, in a total volume of 3 mL. After adding the dicarbonyl compounds, the solutions were maintained incubated at 70 °C, in a stove (Mettmert, model 1500), under air and in the dark, during 28 days. Dicarbonyls 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione solutions were 60 : 40; methanol : water (v/v), accounting for their lack of solubility in water. Moreover, in order to avoid reversible acetal formation for the methylglyoxal dicarbonyl starting solution, the reaction mixture was initiated at room temperature and subsequently incubated at the desired temperature (70 °C). Time counting for this latter reaction was not started before the first 30 min of reaction. Furthermore, aliquots of 200 μ L were taken, at fixed time intervals, and immediately frozen at – 80 °C (short time periods).

ESI-MS and ESI-MSⁿ analysis

The mass spectra were obtained on a Finnigan LCQ Duo ion trap mass spectrometer equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The source was maintained at a 4.5 kV voltage and coaxial sheath and auxiliary gases (both nitrogen) flow-rates were *ca.* 20 – 40 psi. Furthermore, the capillary was kept at *ca.* 10 V voltage and maintained heated at 220 °C. The pressure (capillary/skimmer region), measured with the convectron gauge during electrospray experiments, was normally 0.92 torr. The base pressure, in the mass analyser region, was *ca.* 1.12×10^{-5} torr. The mass spectra recorded were obtained by diluting stored samples 200 times, in ultrapure water. Samples were introduced directly in the ESI source at a flow-rate of 5 μ L/min. Positive ion mode was selected for the experiments carried out, and the mass range was m/z 50 –

500. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 50 ms (default values), and the recorded mass spectra were based in one minute acquisition.

In the MS² experiments, the selected precursor ions were isolated in the ion trap and forced to collide with helium gas. For ionic species excitation, collision energy, 20 – 50 % of the maximum available collision energy, was applied. This energy magnitude was chosen in order to ensure that the precursor ions could be observed in the ESI-MS² spectra, with a remaining peak intensity of about 1 – 5 % for precursor ions. The mass spectrometer was operated using three microscans with a maximum ion injection time of 200 ms (default values), and the recorded mass spectra were based in one minute acquisitions. Total ion current was above 5×10^3 in all cases. Furthermore, some precursor ions with low m/z values had to be fragmented by setting the $q_{z\text{-excit}}$ parameter at different magnitude orders (from $q_{z\text{-excit}} = 0.25$ to $q_{z\text{-excit}} = 0.4$). MSⁿ experiments were also carried out, especially for the higher molecular weight precursor ions.

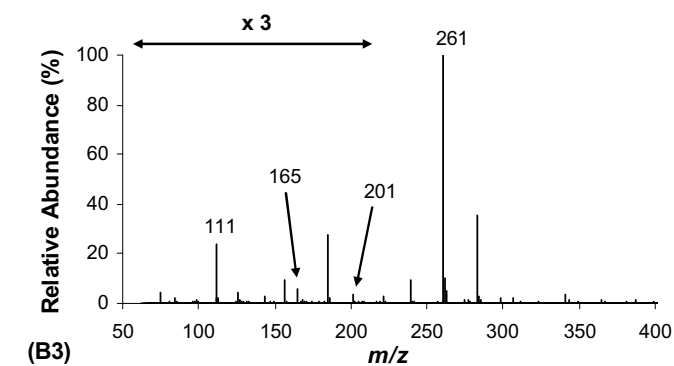
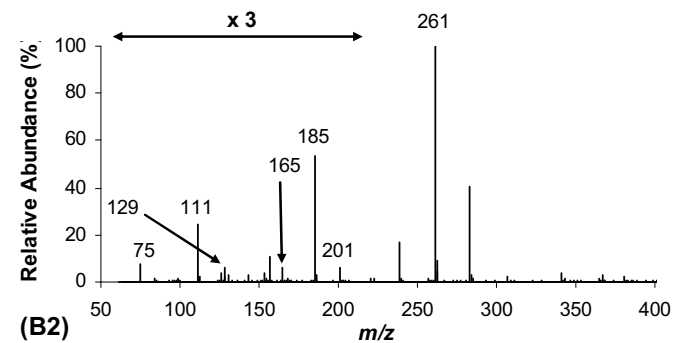
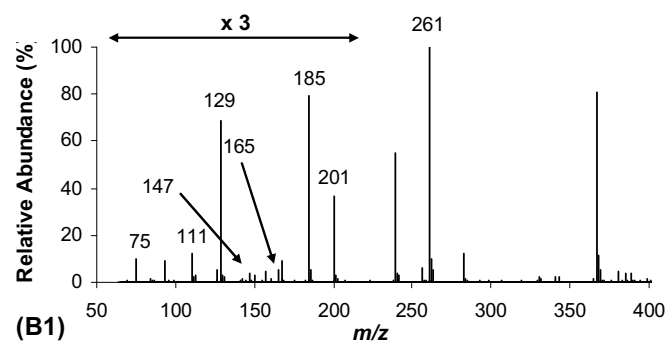
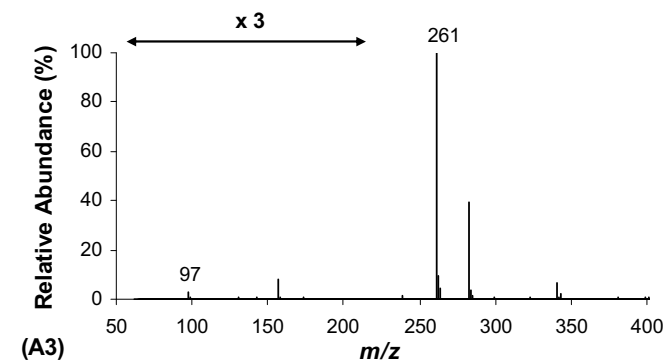
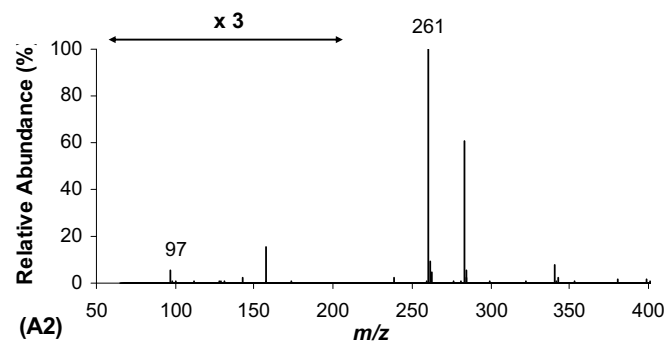
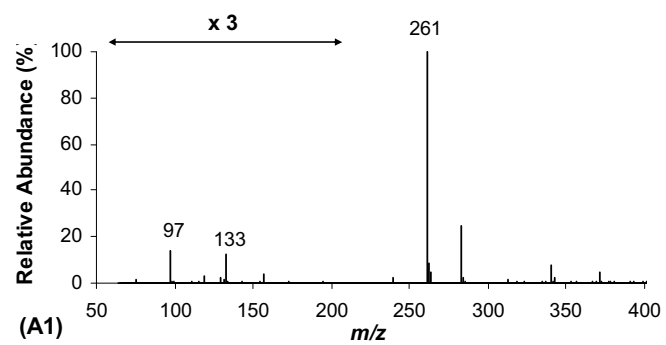
Mass spectrometric data were obtained by using XcaliburTM version supporting software.

Reactions mixtures and ESI-MS analysis were performed in duplicate. ESI-MSⁿ spectra were repeated two to three times.

RESULTS AND DISCUSSION

Behaviour of dicarbonyl reaction systems under ESI mass spectrometry conditions

One of the advantages of ESI-MS is to enable the detection of real ions pre-existing in solution. The reactions of aminoguanidine with dicarbonyls glyoxal, methylglyoxal, diacetyl, 1-phenyl-1,2-propanedione, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione, were studied in this work. ESI mass spectra of aliquots of reaction system solutions were obtained, revealing little or no fragmentation, as it can be seen, for example, for glyoxal, methylglyoxal and 2,3-hexanedione dicarbonyl reaction systems (Fig. 2). The ESI mass spectra exhibited little or no fragmentation, meaning that the ESI-MS conditions used were suitable for the species ionization and ion generation in the gas phase. The most intense peaks, besides the ones corresponding to the HEPES buffer system, were attributed to protonated reaction product molecules. Relative ion abundances are presented in Tables 1 and 2, for all reaction systems. Furthermore, the ion abundances were normalized to m/z 261 buffer ions abundances, and determined at three different reaction times. Moreover, with respect to the dicarbonyl reactions studied, methylglyoxal and diketonic dicarbonyl reactions were the ones that revealed more diversity of ions in the ESI mass spectra.



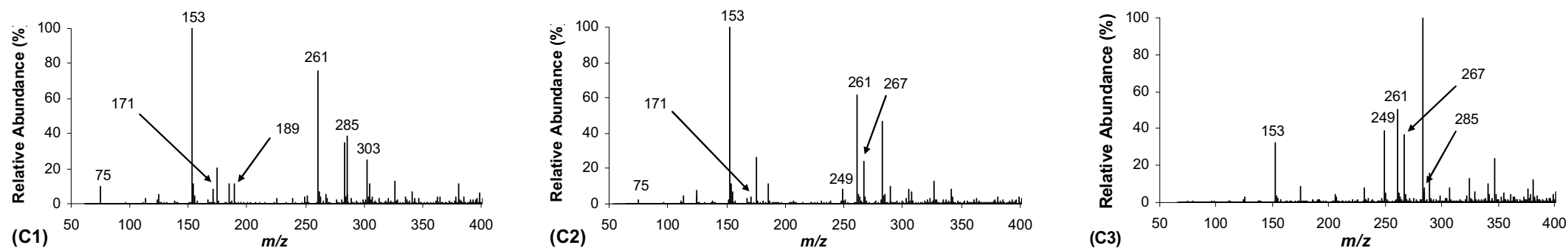


Table 1. Identified compounds based on ESI-MS analysis and normalized relative abundances at three different reaction times, for glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems.

Ions of interest	Reactions systems (aminoguanidine with glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 1-phenyl-1,2-propanedione)			
	<i>m/z</i> [M + H] ⁺ [Rel. abundances (%)]			
	Glyoxal	Methylglyoxal	Diacetyl	1-Phenyl-1,2-propanedione
tetrahydrotriazine (1a)	133 (4.2; ^a d; ^b d ^c)	e	161 (22.1; ^a d; ^b d ^c)	223 (139; ^a 2.5; ^b 0.5 ^c)
tetrahydrotriazine – H ₂ O (2a)	e	129 (20.6; ^a 2.0; ^b d ^c)	e	205 (33.0; 8.6; 1.4)
triazine (3a)	97 (4.6; 1.7; 1.0)	111 (4.0; 8.2; 7.9)	125 (24.0; 19.5; 14.9)	187 (89.6; 155; 85.5)
dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine (1b)	e	e	247 (121; 0.8; d)	371 (192; 3.9; d)
(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – H ₂ O (2b)	e	201 (11.8; 2.1; 1.2)	229 (75.1; 13.7; 5.9)	353 (133; 6.1; 2.1)
{(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 2H ₂ O + dihydroxyimidazolidine-triazine} (1c)	e	183 (0.5; d; d)	211 (14.6; 48.5; 27.1)	335 (81.1; 20.8; 2.4)
{(dihydroxyimidazolidine-triazine) – H ₂ O or (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H ₂ O} (2c) [§]	e	165 (1.5; 2.0; 1.9)	193 (3.9; 14.2; 50.3)	317 (58.2; 2.9; 1.2)

Reaction time ^a 5 min, ^b 1 day and ^c 7 days. d Relative ion abundances < 0.5 %. e Not detected ions. [§] This latter designation, (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H₂O, was attributed to ions **2c**.

The relative ion abundances presented are normalized to *m/z* 261 buffer ions.

Table 2. Identified compounds based on ESI-MS analysis and normalized relative abundances at three different reaction times, for 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione reaction systems.

Ions of interest	Reactions systems (aminoguanidine with 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione)		
	m/z [M + H] ⁺ [Rel. abundances (%)]		
	2,3-Pentanedione	2,3-Hexanedione	3,4-Hexanedione
tetrahydrotriazine (1a)	175 (1.4; ^a d; ^b 0.5 ^c)	189 (15.2; ^a 0.8; ^b 1.2 ^c)	189 (1.8; ^a 0.5; ^b d ^c)
tetrahydrotriazine – H ₂ O (2a)	157 (4.1; 5.5; 3.3)	171 (10.7; 6.1; 1.2)	171 (7.2; 6.0; 1.2)
triazine (3a)	139 (32.3; 142; 37.5)	153 (132; 162; 63.7)	153 (106; 128; 73.4)
dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine (1b)	275 (6.5; 0.7; d)	303 (33.5; 4.5; 3.9)	303 (13.6; 2.7; 2.0)
(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – H ₂ O (2b)	257 (12.8; 0.9; d)	285 (51.0; 8.2; 10.7)	285 (13.4; 6.6; 12.0)
{(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 2H ₂ O + dihydroxyimidazolidine-triazine} (1c)	239 (5.3; 25.7; 18.5) *	267 (6.6; 39.3; 72.2)	267 (5.3; 8.4; 21.3)
{(dihydroxyimidazolidine-triazine) – H ₂ O Or (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H ₂ O} (2c) [§]	221 (1.3; 6.3; 9.7)	249 (4.5; 12.8; 76.2)	249(7.1; 2.6; 9.1)

Reaction time ^a 5 min, ^b 1 day and ^c 7 days. d Relative ion abundances < 0.5. * Ions having some contribution from the buffer ions. [§] This latter designation, (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H₂O, was attributed to ions **2c**. The relative ion abundances presented are normalized to m/z 261 buffer ions.

Identification and characterization of reaction products

ESI-MSⁿ analysis data (Tables 3 and 4), enabled us to establish ion structures for the ions of interest (Tables 1 and 2), as shown in Tables 5 and 6. These attributions are sustained by the fragment ion compositions depicted in Tables 3 and 4. In order to make the discussion on the ion structure attributions more clear, the ions of interest are grouped in three main classes (**a** – **c**). These ion classes encompass: ions **1a**, **2a** and **3a** (class **a**); ions **1b** and **2b** (class **b**); ions **1c** and **2c** (class **c**). The ion classes were based on structural similarities, i.e. the ion classes encompass the more structurally related ions.

Table 3. Relative fragment ions abundances (%) (ESI-MS² analysis), derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 1), for glyoxal, methylglyoxal, diacetyl and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems.

Relative ion abundances (%) Fragment ion composition	<i>m/z</i> (Precursor ion: Glyoxal / Methylglyoxal / Diacetyl / 1-Phenyl-1,2-propanedione)			
	tetrahydrotriazine (ions 1a)	tetrahydrotriazine – H ₂ O (ions 2a)	triazine (ions 3a)	dihydroxyimidazolidine- tetrahydrotriazine (ions 1b)
	133 / – / 161 / 223	– / 129 / – / 205	97 / 111 / 125 / 187	– / – / 247 / 371
[M + H – CH ₄] ⁺	–	–	– / – / 16.1 / –	–
[M + H – H ₃ N] ⁺	–	– / 100 / – / 2.5	–	–
[M + H – H ₂ O] ⁺	100 / – / 49.9 / 100	– / 79.3 / – / 5.2	–	– / – / 100 / –
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / – / 18.8 / –
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ N ₂] ⁺	39.1 / – / – / 25.1	–	–	– / – / – / 1.1
[M + H – CHN] ⁺	–	–	100 / 19.6 / 2.4 / –	–
[M + H – CO] ⁺	–	– / 2.5 / – / –	–	–
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	–	– / – / – / 12.1	–	–
[M + H – H ₄ N ₂] ⁺	–	–	–	– / – / – / 100
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	–	– / 14.6 / – / 34.6	–	–
[M + H – C ₂ H ₅ N] ⁺	–	–	– / – / 100 / –	–
[M + H – C ₃ H ₅ N] ⁺	–	–	– / 100 / 16.8 / –	–
[M + H – C ₃ H ₃ NO] ⁺	–	– / 6.6 / – / –	–	–
[M + H – CH ₂ N ₄] ⁺	–	– / – / – / 4.1	–	–
[M + H – C ₃ H ₅ N ₃] ⁺	–	–	– / – / – / 100	–
[M + H – dicarb] ⁺	29.8 / – / 100 / 77.9	–	–	–

(continued overleaf)

Table 3 (continued).

Relative ion abundances (%)	<i>m/z</i> (Precursor ion: Glyoxal / Methylglyoxal / Diacetyl / 1-Phenyl-1,2-propanedione)		
	(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – H ₂ O (ions 2b)	(a) and (b) (ions 1c)	(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H ₂ O (ions 2c)
Fragment ion composition	– / 201 / 229 / 353	– / 183 / 211 / 335	– / 165 / 193 / 317
[M + H – H ₃ N] ⁺	–	– / 100 / – / –	– / 5.9 / 27.0 / –
[M + H – H ₂ O] ⁺	– / 100 / 100 / 2.1	– / 33.2 / 100 / 54.7	– / 47.4 / 90.3 / –
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	– / – / 1.6 / –	–	–
[(M + H – H ₂ O) – CO] ⁺	–	– / 5.5 / – / –	–
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ N ₂] ⁺	– / 50.0 / 9.1 / –	– / 4.1 / 38.6 / 24.1	–
[M + H – CO] ⁺	–	–	– / 100 / – / –
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	–	– / – / – / 8.5	– / – / – / 100
[M + H – CO – C ₂ H ₄] ⁺	–	–	– / 39.5 / – / –
[M + H – C ₂ H ₄ – C ₂ H ₅ N] ⁺	–	–	– / – / – / 1.8
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	–	– / 8.8 / 25.9 / 100	– / 32.1 / 100 / –
[M + H – C ₂ H ₅ N] ⁺	–	–	– / – / – / 9.7
[M + H – C ₉ H ₆ O] ⁺	–	–	– / – / – / 1.2
[M + H – dicarb] ⁺	– / 16.9 / 1.7 / 100	–	–
[M + H – dicarb – CH ₂ N ₂] ⁺	–	– / – / – / 3.5	–

– Not detected.

Dicarb stands for dicarbonyl.

Table 4. Relative fragment ions abundances (%) (ESI-MS² analysis), derived from precursor ions identified in the ESI mass spectra (Table 2), for 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione reaction systems.

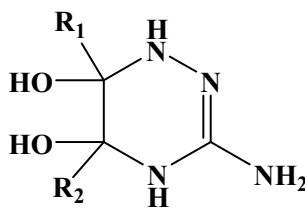
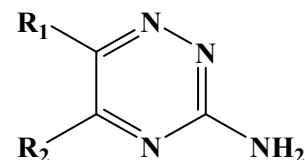
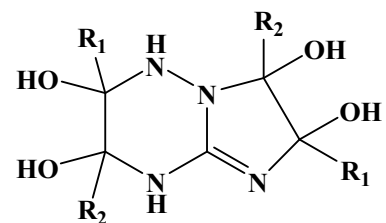
Relative ion abundances (%) Fragment ion composition	<i>m/z</i> (Precursor ion: 2,3-pentanedione / 2,3-hexanedione / 3,4-hexanedione)						
	tetrahydrotriazine (ions 1a)	tetrahydrotriazine – H ₂ O (ions 2a)	triazine (ions 3a)	dihydroxy- imidazolidine- tetrahydrotriazine (ions 1b)	(dihydroxy- imidazolidine- tetrahydrotriazine) – H ₂ O (ions 2b)	(a) and (b) (ions 1c)	(dihydroxy- imidazolidine- tetrahydrotriazine) – 3H ₂ O (ions 2c)
	175 / 189 / 189	157 / 171 / 171	139 / 153 / 153	275 / 303 / 303	257 / 285 / 285	239 * / 267 / 267	221 / 249 / 249
[M + H – CH ₄] ⁺	–	–	20.9 / – / 10.2	–	–	–	–
[M + H – H ₃ N] ⁺	–	8.0 / 5.0 / 15.8	3.9 / – / 1.3	–	–	–	–
[M + H – H ₂ O] ⁺	68.3 / 79.3 / 100	83.8 / 100 / 100	–	100 / 100 / –	100 / 100 / 1.2	100 / 100 / 100	76.9 / 100 / –
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	3.7 / 3.8 / –	14.2 / 19.5 / –	–	–
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ N ₂] ⁺	– / 1.1 / –	–	–	–	10.4 / 15.6 / –	46.7 / 4.7 / 13.1	8.2 / – / –
[M + H – CHN] ⁺	–	–	1.5 / – / 4.7	–	–	–	–
[M + H – C ₂ H ₄] ⁺	–	15.5 / 2.1 / 10.9	– / 100 / 20.8	–	–	–	–
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	–	71.2 / 36.1 / 52.1	100 / 27.0 / 100	–	–	57.1 / 15.5 / 17.5	100 / 14.8 / –
[M + H – C ₃ H ₅ N] ⁺	–	–	– / – / 2.3	–	–	–	–
[M + H – CH ₃ N ₃] ⁺	–	–	6.0 / – / 4.7	–	–	–	–
[M + H – C ₃ H ₃ NO] ⁺	–	–	–	–	–	–	– / 15.1 / –
[M + H – CH ₂ N ₄] ⁺	–	7.7 / 5.9 / 18.2	– / – / 23.4	–	–	–	–
[M + H – C ₄ H ₈ O] ⁺	–	–	–	–	– / 2.5 / –	–	15.2 / – / –
[M + H – C ₃ H ₇ NO] ⁺	–	40.4 / – / –	–	–	–	–	–
[M + H – C ₅ H ₈ O] ⁺	–	–	–	–	–	–	19.2 / – / –
[M + H – C ₅ H ₇ NO] ⁺	–	15.6 / – / –	–	–	–	–	–
[M – C ₅ H ₁₀ NO] ⁺	–	100 / – / –	–	–	–	–	–
[M – C ₄ H ₉ N ₂ O] ⁺	–	–	–	–	–	25.0 / 3.9 / 4.8	– / 2.1 / –
[M + H – C ₆ H ₉ NO] ⁺	–	– / 10.3 / 12.7	–	–	–	–	–
[M + H – dicarb] ⁺	100 / 100 / 71.1	–	–	–	53.4 / 34.1 / 100	–	–

* ESI-MS/MS spectra were recorded for *m/z* 239 ion from a 14 days aliquot solution of the 2,3-pentanedione reaction system, in order to minimize the influence of *m/z* 239 buffer ion.

– Not detected.

Dicarb stands for dicarbonyl.

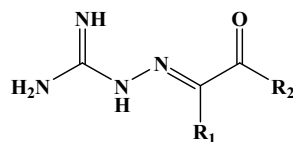
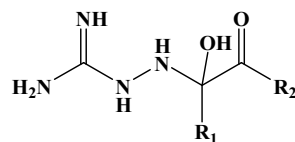
Table 5. Proposed ion structures for the compounds of interest identified in the ESI mass spectra; ions **1a-1b** (Tables 1 and 2).

Reaction Systems	Possible ion structures ^a			
	tetrahydrotriazine (ions 1a) ^{b, d}	tetrahydrotriazine – H ₂ O (ions 2a) ^{c, e}	triazine (ions 3a)	dihydroxyimidazolidine- tetrahydrotriazine (ions 1b)
Glyoxal		—		—
Methylglyoxal ^c				
Diacetyl				
1-Phenyl- 1,2-propanedione ^{b,c}				
2,3-Pentanedione				
2,3-Hexanedione				
3,4-Hexanedione				

^a All ion structures proposed refer to singly protonated molecules, [M + H]⁺.

^b

^c



protonated hydrazone intermediates molecules for methylglyoxal (c) and 1-phenyl-1,2-propanedione

(b,c) reactions systems.

^d Ion structure not detected in the methylglyoxal reaction system.

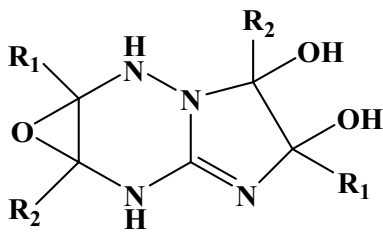
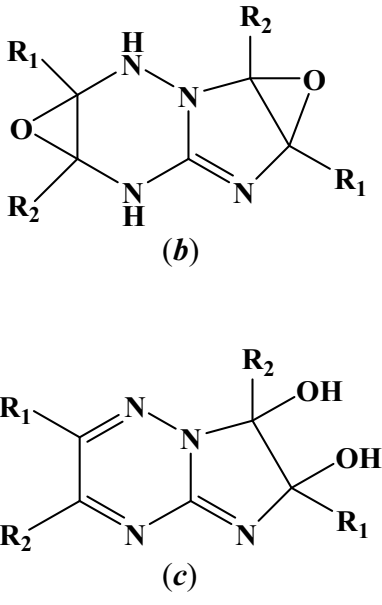
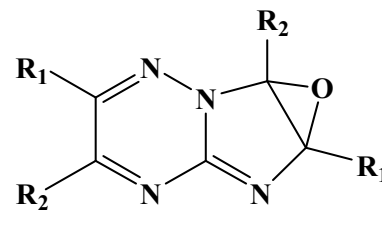
^e Ion structure not detected in the diacetyl (and glyoxal) reaction system.

– Not detected.

R_1 = H (glyoxal and methylglyoxal), CH_3 (diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 1-phenyl-1,2-propanedione) and CH_2CH_3 (3,4-hexanedione).

R_2 = H (glyoxal), CH_3 (methylglyoxal and diacetyl), CH_2CH_3 (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione), $CH_2CH_2CH_3$ (2,3-hexanedione) and phenyl (1-phenyl-1,2-propanedione).

Table 6. Proposed ion structures for the compounds of interest identified in the ESI mass spectra; ions **2b-2c** (Tables 1 and 2).

Reaction Systems	Possible ion structures ^a		
	(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – H ₂ O (ions 2b)	(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 2H ₂ O ^(b) and dihydroxyimidazolidine-triazine ^(c) (ions 1c)	(dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H ₂ O (ions 2c)
Glyoxal	–	–	–
Methylglyoxal			
Diacetyl			
1-Phenyl-1,2-propanedione			
2,3-Pentanedione			
2,3-Hexanedione			
3,4-Hexanedione			

^a All ion structures proposed refer to singly protonated molecules, $[M + H]^+$. Two alternative ion structures ^{b, c} were attributed to ions **1c**. – Not detected.

R₁ = H (methylglyoxal), CH₃ (diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 1-phenyl-1,2-propanedione) and CH₂CH₃ (3,4-hexanedione).

R₂ = CH₃ (methylglyoxal and diacetyl), CH₂CH₃ (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione), CH₂CH₂CH₃ (2,3-hexanedione) and phenyl (1-phenyl-1,2-propanedione).

Class a (ions 1a-3a)

Fragmentation of ions **1a**, at m/z 133 (glyoxal), 161 (diacetyl), 223 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 175 (2,3-pentanedione) and 189 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), is depicted in Tables 3 and 4. These ions fragmented to give prominent losses of one water molecule and one dicarbonyl molecule (Tables 3 and 4). After ions **1a** lose one dicarbonyl molecule, protonated aminoguanidine molecules result as fragment ions (not shown). The structure of protonated tetrahydrotriazine molecules was attributed to ions **1a** (Table 5). Ions **1a** fragment ion composition was found to be similar to the ones proposed for acetyl-dihydroxyimidazolidines²⁰ (resulting from acetyl-arginine reactions) and dihydroxyimidazolidines²¹ (resulting from guanidine reactions), where water and dicarbonyl molecules losses mainly occurred. This observation reinforces the ion structures attributed.

Ions **2a**, at m/z 129 (methylglyoxal), 205 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 157 (2,3-pentanedione) and 171 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), fragmented to give a more complex fragment ion composition, in comparison to ions **1a**. Losses of one water molecule and CH_2N_2 were the most prominent ones observed, in ions **2a** fragmentation. Losses of one NH_3 molecule and 28 Da (CO or C_2H_4) were also common in ions **2a** fragmentation. Loss of CH_2N_4 was observed for the diketonic dicarbonyl reaction systems only (Tables 3 and 4), appearing to result from a hetero ring structure, and not from an open chain aminoguanidine-derived molecule. In fact, for ions **2a** that possess an open chain structure, the occurrence of the mentioned CH_2N_4 loss requires a long range proton displacement, which is not favourable in comparison to what is predicted in the fragmentation of ions **2a** with cyclic structures. Other losses such as $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}$ (methylglyoxal), $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$ (2,3-pentanedione), $\text{C}_5\text{H}_7\text{NO}$ (2,3-pentanedione), $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}^+$ (2,3-pentandione) and $\text{C}_6\text{H}_9\text{NO}$ (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) were

observed in ions **2a** fragment ion composition (Tables 3 and 4). They are indicative of the presence of dicarbonyl moieties, in the process of ring formation. In addition, these losses appear to result from an epoxy/carbonyl group ring formation and they are consistent with the dicarbonyls substituents in the starting dicarbonyls molecules. Some losses, such as CH_2N_4 , in particular, appear to result from hetero ring formation in precursor ions **2a** fragmentation. The loss of CH_2N_2 , in ions **2a** fragmentation, also observed in ions **1a** fragmentation, after the elimination of one water molecule, suggests that ion **1a** and **2a** structures are related, although the latter ion structures should be more stable than the former. These observations led us to attribute the structures of protonated tetrahydrotriazine – H_2O molecules to ions **2a** (Table 5). The losses of 17 (NH_3) and 28 Da (CO) were observed in the fragmentation of the metemitron compound (Fig. 1), which possesses a structure similar to ions **2a**.²² It deserves mentioning, for methylglyoxal and 1-phenyl-1,2-propanedione systems, in particular, that the structures of protonated hydrazone²³ molecules (open chain structure forms) could be attributed to ions **2a** (Table 5), since the loss of CH_2N_4 was not observed (or it was barely observed) in the fragmentation of ions **2a** for the referred dicarbonyl systems (Table 3). In fact, in these two mentioned dicarbonyl systems the formation of hydrazones, leading to triazines formation, can favourably occur. This may be due to the important dicarbonyl electrophiles energetic difference²³ in the reacted 1-phenyl-1,2-propanedione molecules, as well as in the reacted methylglyoxal ones, together with the fact that dicarbonyl electrophiles in methylglyoxal molecules are importantly stabilized.

Ions **3a**, at m/z 97 (glyoxal), 111 (methylglyoxal), 125 (diacetyl), 187 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 139 (2,3-pentanedione), 153 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), fragmented to give rise to somewhat distinct fragment ion compositions (Table 5). The losses of CHN (glyoxal), $\text{C}_3\text{H}_5\text{N}$ (methylglyoxal), $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$

(diacetyl), $C_3H_5N_3$ (1-phenyl-1,2-propanedione), CH_2N_2 (2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione) and C_2H_4 (2,3-hexanedione) were observed as the most prominent ones (Tables 3 and 4). It should be noted that ions **3a** fragmented in a similar way, accounting for the different dicarbonyl-derived substituents in the aminoguanidine-derived reaction product molecules. CHN , C_3H_5N , C_2H_5N and $C_3H_5N_3$ losses mentioned, and also C_2H_4 , are representative of the presence of dicarbonyl substituents (H, methyl and ethyl) in a heterocyclic ring structure. In the 2,3-pentanedione and 3,4-hexanedione reaction systems, CH_2N_2 and CH_5N_3 losses occurred (Table 4). Although they do not include dicarbonyl moieties, they may be related to hetero ring formation. Since the prominent CH_2N_2 loss was equally observed in ions **2a** and **3a** fragment ion compositions, for the heavier alkyl-diketonic dicarbonyls, it seems reasonable to assume that these ions possess similar ion structures. In ions **3a** fragment ion composition, some losses observed, of CH_4 and C_2H_4 , do not include oxygen, but have the contribution of dicarbonyl substituents. These losses were found to be more important in ions **3a** fragment ion composition than in ions **2a** fragmentation (Table 4). In ions **3a** fragment ion composition also, losses that do not include reacted dicarbonyl molecules, e.g. CH_2N_2 , CH_5N_3 and CH_2N_4 , are more important, than in ions **2a** fragmentation. These observations seem to suggest that ions **3a** hetero ring structures are more stable than the ones proposed for ions **2a**. All these aspects led us to assume that ions **1a**, **2a** and **3a** are structurally related. In fact, ions **1a**, **2a** and **3a** are related by 18 Da and ions **1a** to **3a** dehydration is in agreement with the corresponding fragment ion compositions. In the fragment ion compositions of the most dehydrated ions, mainly ions **2a** and **3a**, more energetic losses occur from the hetero rings formed. Therefore, the structures of protonated triazine molecules were attributed to ions **3a** (Table 5). It is to bear that a commercially available triazine, with a molecular structure identical to the aminoguanidine glyoxal-derived triazine, revealed, in their

fragmentation, the unique and important loss of CHN (not shown). This result was identical to the observed in the fragmentation of the protonated glyoxal-derived triazine molecules (Table 3).

*Class **b** (ions **1b** and **2b**)*

Ions **1b**, at m/z 191 (glyoxal), 219 (methylglyoxal), 247 (diacetyl), 371 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 275 (2,3-pentanedione) and 303 (2,3-hexanedione) (Table 2), fragmented similarly, with losses of one to two water molecules, namely (Tables 5 and 6). Loss of two water molecules also suggests that two dicarbonyl molecules must be involved in ions **1b** formation. This can be rationalized in terms of the water molecule losses observed in ions **1a** and **2a** fragment ion compositions where, in either ion structures, one water molecule loss was observed (Tables 3 and 4). Furthermore, ESI-MS³ analysis of the fragment ions derived from precursor ions **1b**, by loss of one water molecule, revealed a fragment ion composition similar to the one observed for ions **2b**, further discussed. To better explain ions **1b** structure attribution, ions **2b** should first be discussed. Ions **2b**, at m/z 201 (methylglyoxal), 229 (diacetyl), 353 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 257 (2,3-pentanedione), 285 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), fragment to give losses of one to two water molecules, the second water molecule loss being more significant for the heavier alkyl-diketonic dicarbonyls (Table 4). An important loss of one dicarbonyl molecule was also observed in ions **2b** fragment ion composition (Tables 3 and 4). Furthermore, ESI-MS³ analysis of the most abundant fragment ions, proved that after ions **2b** lose one dicarbonyl molecule, ions **2a** resulted as fragment ions. Two dicarbonyl molecules are indeed involved in ions **2b** formation. This led us to attribute the structure of the protonated (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – H₂O molecules to ions **2b** (Table 6).

Moreover, knowing that ions **1b** fragment ions, resulting from the loss of one water molecule, were indeed found to be ions **2b** (ESI-MS³), we attributed to ions **1b** the structures of protonated dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine molecules (Table 5). Regarding the latter ion structures attributed, it should be noted that tetrahydrotriazines appear to react with one dicarbonyl molecule, leading to the formation of dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazines. As it will be further discussed, ions **2b**, after losing one water molecule, give rise to fragment ions, found to have fragment ion compositions similar to the one of ions **1c** (ESI-MS³ analysis).

Class c (ions 1c and 2c)

Ions **1c**, at m/z 183 (methylglyoxal), 211 (diacetyl), 335 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 239 (2,3-pentanedione), 267 (2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione) (Table 2), revealed similar fragment ion compositions, in what the most abundant losses are concerned (Tables 3 and 4). Prominent losses are one water molecule and CH₂N₂ (Tables 3 and 4). Two alternative ion structures were proposed for ions **1c**, since the fragment ion composition of ions **1c** does not argue for a unique ion structure attribution. Thus, the occurrence of, on the one hand, a prominent one water molecule loss, particularly for the alkyl-diketonic dicarbonyl reaction systems (diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione), together with CO loss (methylglyoxal), after the loss of one water molecule and, on the other, the loss of one dicarbonyl molecule + CH₂N₂ (1-phenyl-1,2-propanedione) (Tables 3 and 4), suggested a imidazolidine ring development. Hence, the structures of the protonated molecules of dihydroxyimidazolidine-triazine were attributed to ions **1c** (Table 6 – **b**). Moreover, significant losses of CH₂N₂, also occurring after the loss of one water molecule, NH₃ (glyoxal) and C₂H₄ (1-phenyl-1,2-propandione), are indicative of tetrahydrotriazines –

H₂O fragmentation (ions **2a**) (Tables 3 and 4). Therefore, the structures of protonated molecules of (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazines) – 2H₂O have been attributed to ions **1c** (Table 6 – c). In the latter ion structure attribution, the loss of CO, for aldehydic dicarbonyls especially, should be expected to be significant in ions **1c** fragmentation. A similar ion structure, composed of two singly dehydrated imidazolidine rings, i.e. the bis(dihydroxyimidazolidines) – 2H₂O (diacetyl reaction with guanidine), was found, upon fragmentation, to give rise to a less significant CO loss.²¹ With respect to protonated molecules of dihydroxyimidazolidine-triazine, in the first ion structure attributed, the release of one dicarbonyl molecule was predicted to be enhanced, since imidazolidines favourably lose this neutral molecule upon fragmentation. This can be explained on the grounds of the imidazolidine ring stability influence that might occur, due to the influence of the triazine ring connected. In fact, the two structures proposed are consistent with the fragment ion composition depicted for ions **1c**. ESI-MS³ analysis suggests that the fragment ions resulting from precursor ions **2b**, by one water molecule loss, should have the same fragment ion composition as ions **1c**, for the alkyl-diketonic dicarbonyls, diacetyl, 2,3-pentanedione, 2,3-hexanedione and 3,4-hexanedione, especially. Thus, we can assume that for the alkyl-diketonic dicarbonyls, the formation of (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazines) – 2H₂O could prevail over the formation of dihydroxyimidazolidine-triazines. These latter compounds, however, do not seem to be related to (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazines) – H₂O formation (**2b**). For the alkyl-diketonic dicarbonyls, the tetrahydrotriazine forms contribution could be more important than the corresponding triazines forms contribution, in what their reactivity towards a subsequent dicarbonyl molecule is concerned. It should be mentioned that, in general, when ions **1c** lose one water molecule, ESI-MS³ analysis shows that resulting

fragment ions have a fragment ion composition similar to ions **2c**. This aspect shall be further approached.

Ions **2c**, at m/z 165 (methylglyoxal), 193 (diacetyl), 317 (1-phenyl-1,2-propanedione) (Table 1), 221 (2,3-pentanedione), 249 (2,3-hexanedione) (Table 2), fragmented to give, in general, one water molecule and CH_2N_2 , as major losses (Tables 3 and 4). Moreover, the loss of CO (or C_2H_4 , where adequate) was also followed by C_2H_4 (methylglyoxal) and $\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$ (1-phenyl-1,2-propanedione) losses, indicative of the triazines fragmentation (ions **3a**) (Tables 3 and 4). Minor losses, of $\text{C}_3\text{H}_3\text{NO}$ (2,3-hexanedione), $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ (2,3-pentanedione), $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$ (2,3-pentanedione), $\text{C}_4\text{H}_9\text{N}_2\text{O}^+$ (2,3-pentanedione) and $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}$ (1-phenyl-1,2-propanedione), suggest that an epoxy group has been formed. In addition, $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}$ (2,3-pentanedione) and $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}$ (1-phenyl-1,2-propanedione) losses are representative of the entire dicarbonyl moieties formed in a hetero ring. The fact that, in ions **2c** fragmentation, neutral losses appear to result from a triazine ring formed, and from the development of dicarbonyl moieties in a hetero ring structure, suggest the occurrence of imidazole ring formation, connected to a triazine ring in ions **2c** structures. To reinforce this assumption, the fragment ions which resulted from the loss of one water molecule from precursor ions **1c**, were found to have a fragment ion composition similar to ions **2c**. In fact, fragment ions resulting from precursor ions **1c**, by the loss of one water molecule can, in both ions **1c** structures proposed, generate similar fragment ion compositions. This contribution may, however, be more likely attributed to dihydroxyimidazolidine-triazine fragmentation, than to (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – $2\text{H}_2\text{O}$ fragmentation. This can be explained by the fact that one water molecule release is predicted to more likely occur in dihydroxyimidazolidine-triazines fragmentation than in dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazines – $2\text{H}_2\text{O}$, since the former possesses an imidazolidine ring. Thus, we attributed the structures of the

protonated (dihydroxyimidazolidine-tetrahydrotriazine) – 3H₂O molecules to ions **2c** (Table 6).

Considerations regarding the reaction products formed

In this section it is important to refer that accordingly to the methodology developed by us to study reactions in solution by ESI-MS off-line techniques,¹⁵ the relative abundances of ions identified in the ESI mass spectra, vary linearly with ions concentration in solution, especially for ions concentration in the following range 10⁻⁵ – 10⁻³ M.¹⁵ This concentration range shows therefore to be suitable to study the reactions in question, since the HEPES buffer species appear to enhance ions ESI signals. This may be due to the fact that the referred HEPES buffer species have both electrolyte and surfactant nature.¹⁵ Indeed, these observations are in agreement with the results obtained by Constantopoulos et al.,¹⁸ in a study performed to investigate the effect of salt concentration on analyte ion response, and under the application of the partitioning equilibrium model. Although the developed methodology, concerning the ESI-MS analyses of analytes in the presence of a compound having both surfactant and electrolyte nature (HEPES buffer), allows comparisons among the relative ion abundances obtained, such comparisons are only considered for ions belonging to each class, i.e. the ions more structurally related and with closer m/z values. This minimizes different ionization efficiencies that analyte ions can develop towards the HEPES buffer ions, and minimizes mass-dependent discrimination²⁴ in the mass spectrometer.

In the reactions of aminoguanidine with the selected α -dicarbonyls, the compounds belonging to two different classes were identified, namely triazines (aminotriazines), and their hydrated forms, and compounds having bicyclic ring structures. In the literature, triazines were first isolated by Erickson,¹⁶ during the study of

the reactions of aminoguanidine salts with α -dicarbonyl compounds, such as glyoxal and diacetyl. More recently, triazines compounds have been reported to be formed also in the reaction of aminoguanidine with some of the dicarbonyl compounds here used, in particular glyoxal and methylglyoxal.¹⁷ The aminoguanidine reactions were monitored, under ESI-MS conditions, and triazines were detected in the early beginning of the reactions, such as five minutes (Tables 1 and 2). They were however even detected after 14 days reaction (not shown). This observation is consistent with triazines being relatively stable compounds, at least under the reaction conditions investigated. Tetrahydrotriazines (**1a**) and tetrahydrotriazines – H₂O (**2a**) were also detected for most of the reaction systems investigated. Their detection occurred mostly in the early beginning of the reactions, *ca.* five minutes to one day (Tables 1 and 2), suggesting that they could be triazines reaction precursors. In the literature, it has been observed that the reaction of aminotriazine with α -halo carbonyl compounds, in particular, is regioselective, regarding triazines formation.²³ To this purpose, the reactions of aminoguanidine with compounds having two electrophilic sites, with different energetics, can proceed to the formation of isomeric triazine reaction products.²³ The formation of triazine isomeric reaction products have also been observed in the reaction of aminoguanidine with methylglyoxal.¹⁷ Limanto et al., in a study concerning a regioselective approach development for substituted triazines formation, have reasoned that the formation of hydrazone, an intermediate involved in triazines formation, occurs when the difference in reactivity between the two electrophilic sites of α -halo carbonyls is more pronounced.²³ Nevertheless, in the present study we did not identify any hydrazone form in the reactions of aminoguanidine, which can be explained by the minor different electrophiles energetic difference of the dicarbonyl molecules studied. In fact, gas phase results indicated that hydrated triazines forms exist preferably in cyclic

structures. Not disregarding our results, there is however, a possibility that in methylglyoxal and 1-phenyl-1,2-propanedione reaction systems, in particular, the formation a hydrazone form could result, in equilibrium with the corresponding cyclic form. For methylglyoxal reaction system, hydrated triazine forms, under fragmentation, did not reveal the loss of CH_2N_4 (Table 3), a loss earlier used to explain the formation of heterocyclic forms. For 1-phenyl-1,2-propanedione system, although almost negligible, the referred loss was observed (Table 3). This latter information, together with the fact that high relative abundances were noted in the ESI mass spectra, for protonated hydrated triazine forms, in comparison to the corresponding ones for the remaining reaction systems studied, suggest that a stable hydrated triazine form has been developed for 1-phenyl-1,2-propanedione reaction system. The stable hydrated triazine form could be a hydrazone form. This is consistent with the fact that 1-phenyl-1,2-propanedione molecules possess electrophiles with very different energetics.²³ Indeed this electrophiles energetic difference is the most enhanced in the dicarbonyl molecules studied. Furthermore, for diketonic alkyl-substituted reaction systems, in particular, the reactions, leading to triazines formation, appear not to be selective, which is consistent with the mechanistic perspective of Limanto et al.²³ concerning the dicarbonyl electrophiles energetic difference.

Regarding the bicyclic ring structures formed, i.e. compounds **1b**, **2b**, **1c** and **2c**, in the reactions of aminoguanidine with diketonic dicarbonyls mostly, it appears that tetrahydrotriazines and triazines react with a subsequent dicarbonyl molecule. This situation can indeed occur, especially for triazines, since the heterocyclic structures in question can have several equilibrium species, allowing therefore to the favourable formation of bicyclic compounds. The existence of structurally different triazines in solution could be due to the π electron density redistribution in aminoguanidine

molecules, which is strong, even when compared to its biogenic guanidine.¹² In order to prove that the mentioned bicyclic ring structures could be formed in the reaction of triazine (aminotriazine) with a dicarbonyl molecules, we have reacted a commercially available 3-amino-1,2,4-triazine (aminoguanidine glyoxal-derived triazine) with diacetyl and 2,3-hexanedione, in particular. Several reaction products were identified, under ESI-MS conditions (not shown). These reaction products corresponded mostly to the formation of bicyclic compounds, with molecular structures similar to dihydroxyimidazolidine-triazines (**1c**) and to their dehydrated forms, identified in aminoguanidine reactions. The fragmentation of the corresponding protonated molecules led us to assume that the formation of a bicyclic ring can occur in solution, and that the reacted dicarbonyl molecule should not be present in an open chain form. Therefore, since dihydroxyimidazolidines-triazine, in particular, were identified in both the reactions of aminoguanidine and of an aminotriazine, with dicarbonyls, it is more likely that these compounds are reaction products present in solution and not species formed in the gas phase environment of the mass spectrometer. To reinforce this assumption, the formation of a dihydroxyimidazolidine-triazine derivative, resulting from the reaction of a substituted aminotriazine with glyoxal, in the presence of alcoholic solvents, was reported in the literature.²⁵ This compound was also reported to be involved in the reaction mechanism proposed for the formation of dihydroimidazotriazines.²⁵ In this study, Garnier et al. did not succeed to isolate the dihydroxyimidazolidine-triazine intermediate, but they were able to establish that the resulting dehydrated form of the intermediate was indeed unstable.²⁵ The mentioned dehydrated form corresponds to a single dehydrated dihydroxyimidazolidine-triazine derivative (Table 6). In this study also,²⁵ it deserves mentioning that the reaction of substituted triazines with glyoxal, in the presence of alcohol, was performed at 80 °C, which resembles the reaction conditions

used in the present study (70 °C). Similarly to what has been described by Garnier et al.,²⁵ we were also not able to identify a dihydroxyimidazolidine-triazine, for the reaction of aminoguanidine with glyoxal. Nevertheless, in the present study this compound was observed for the diketonic dicarbonyl systems, in particular. This observation may sustain that more stable dihydroxyimidazolidine-triazines are probably developed in the diketonic dicarbonyl reaction systems, in comparison to the aldehydic dicarbonyl systems, also further reinforced by the significant formation of triazines in the diketonic dicarbonyl systems. In the diketonic dicarbonyl systems both dihydroxyimidazolidine-triazine and their corresponding dehydrated forms were identified. This observation seems to agree with the reaction mechanism proposed by Garnier et al., for the formation of dihydroimidazotriazines via dihydroxyimidazolidine-triazines.²⁵ It appears also to be consistent with the fact that dehydrated dihydroxyimidazolidine-triazines can be generated in the reaction of triazines with α -dicarbonyls. The results concerning the reactivity of aminoguanidine and the triazine investigated, in particular, seem to further sustain the ability and importance of triazines condensations, which has been recognized as potentially active building blocks in fields such as agrochemical and medicine.^{26,27}

CONCLUSIONS

The reactions of aminoguanidine with several aldehydic and diketonic α -dicarbonyls were studied and reaction products identified. The ions identified revealed, upon fragmentation (ESI-MSⁿ), relations within each identified ions class. Within each identified ions class, the most dehydrated compound forms revealed losses that can support the formation of stable heterocyclic ring structures. Losses from the dicarbonyl moieties formed, including dicarbonyl substituents and carbonyl/epoxy group formation, were observed in the fragmentation of most dehydrated ion structures identified. In each compound class assigned, the ions differed from 18 Da and the fragment ion compositions were consistent with increased stability of the most dehydrated ion forms, in comparison to their precursor forms, within the class of ions assigned. The reaction of aminoguanidine with α -dicarbonyls seems therefore to be very complex. Besides the reported formation of triazines, already proposed to occur in solution, for the reaction of aminoguanidine with some dicarbonyls here studied, e.g. glyoxal, methylglyoxal and diacetyl,^{16,17} possible triazines precursors, such as tetrahydrotriazines and singly dehydrated tetrahydrotriazines, were identified for most of the reaction systems investigated.

In this study, the aminoguanidine reactions were approached regarding its regioselectivity.²³ For alkyl diketonic dicarbonyls reaction systems, the reactions leading to triazines formation appear not to be selective, with respect to the reactivity of the dicarbonyl electrophilic sites of molecules. This is explained by the fact that alkyl diketonic dicarbonyl molecules possess dicarbonyl electrophiles with minor different energetics, and with the electrophiles being less stabilized. In addition, the reactions of aminoguanidine with methylglyoxal and 1-phenyl-1,2-propanedione, in particular, leading to triazines formation, can proceed to the formation of hydrazones. These latter

intermediates are structurally non cyclic, in comparison with cyclic tetrahydrotriazines, these latter proposed to occur for the reaction systems investigated. For methylglyoxal reaction system, gas phase results suggest the possibility that the hydrazone intermediate could be formed, being in equilibrium with its corresponding cyclic form (tetrahydrotriazine). This situation is consistent with literature data, concerning the formation of triazines isomeric forms, in the reaction of aminoguanidine with methylglyoxal, in particular.¹⁷ For 1-phenyl-1,2-propanedione reaction system, gas phase results indicated the formation of a very stable hydrated triazine precursor, in comparison to the remaining dicarbonyl systems. This seems to be due to the very different dicarbonyl electrophiles energetics in 1-phenyl-1,2-propanedione molecule. This difference is enhanced in comparison to the remaining dicarbonyl molecules studied, and therefore consistent with the mechanistic perspective of Limanto et al.,²³ established in the study of the aminoguanidine reactions with α -halo dicarbonyls.

In the reactions of aminoguanidine, bicyclic ring structures were also identified, under ESI-MS conditions. These bicyclic ring structures appear to result from the reaction of tetrahydrotriazines and triazines with one subsequent dicarbonyl molecule. Bicyclic ring structures were identified in the reactions of aminoguanidine and of a selected triazine with the dicarbonyls studied, suggesting that they could be reaction products formed in solution. Concerning the reactivity of triazines, in particular, it has been reported in the literature the possible formation of triazine condensation products, in the reaction of substituted triazines with glyoxal.²⁵ Despite these condensation products were not identified in the literature, due to their intrinsic instability, they were included as part of the reaction mechanism proposed for the formation of dihydroimidazotriazines. The latter compounds are structurally related to the dihydroxyimidazolidine-triazines, identified in the present study. These latter compounds were also not observed in the

reactions of aminoguanidine/selected triazine with glyoxal. Nonetheless, for diketonic dicarbonyl systems, in particular, the formation of more stable dihydroxyimidazolidine-triazines eventually resulted, along with its dehydrated forms, supporting the fact that these species can indeed be formed in the reaction of aminoguanidine/selected triazine with α -dicarbonyls. This also supports the reaction mechanism proposed for the formation of dihydroimidazotriazines via dihydroxyimidazolidine-triazines. The present results regarding aminoguanidine/triazine reactivities, further reinforce the importance and versatility of triazines condensations, in the generation of polycyclic ring structures, which have been found to be of recognized utility in fields such as agrochemical and medicine.^{26,27}

This study provides information on the aminoguanidine/selected triazine reactivity with α -dicarbonyls. This information can be valuable to complement solution information concerning aminoguanidine reactivity, since the gas phase data here obtained, appear to correlate well with literature solution data for the reaction systems investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors gratefully acknowledge Doctor Carlos Cordeiro and Professor Ana Ponces Freire of the enzymology group (CQB-FCUL, Portugal) for their inestimable contribution to this work. Discussions with Professor Susana Santos (CQB-FCUL, Portugal) are also acknowledged. One of the authors, M. A. Saraiva, thanks Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) for financial support (SFRH/BD/3162/2000).

REFERENCES

1. Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, Ulrich P, Cerami A. *Science*. 1986; **232**: 1629.
2. Mišur I, Turk Z. *Croat. Chem. Acta*. 2001; **74**: 455.
3. Rahbar S, Figarola JL. *Curr. Med. Chem. – Immun. Endoc. & Metab. Agents*. 2002; **2**: 135.
4. Monnier VM. *Arch. Biochem. Biophys*. 2003; **419**: 1.
5. Thornalley PJ. *Arch. Biochem. Biophys*. 2003; **419**: 31.
6. Bharatam PV, Iqbal P, Malde A, Tiwari R. *J. Phys. Chem. A*. 2004; **108**: 10509.
7. Lieber E, Smith GBL. *Chem. Rev*. 1939; **25**: 213.
8. Ou P, Wolff SP. *Biochem. Pharmacol*. 1993; **46**: 1139.
9. Philis-Tsimikis A, Parthasarathy S, Picard S, Palinski W, Witztum J. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 1995; **15**: 367.
10. Skamarauskas JT, McKay AG, Hunt JV. *Free Rad. Biol. & Med*. 1996; **21**: 801.
11. Nohara Y, Usui T, Kinoshita T, Watanabe M. *Chem. Pharm. Bull*. 2002; **50**: 179.
12. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Biol. Chem*. 2001; **276**: 48967.
13. Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom*. 2005; **246**: 84. (and references therein).
14. Eberlin MN. *Eur. J. Mass Spectrom*. 2007 ; **13**: 19.
15. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. (submitted)
16. Erickson JG. *J. Am. Chem. Soc*. 1952; **74**: 4706.
17. Lo TW, Selwood T, Thornalley PJ. *Biochem. Pharmacol*. 1994; **48**: 1865.
18. Constantopoulos TL, Jackson GS, Enke CG. *J. Am. Soc. Mass Spectrom*. 1999; **10**: 625.
19. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom*. 2006; **41**: 216.
20. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom*. 2006; **41**: 755.

21. Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass Spectrom.* 2006; **41**: 1346.
22. Baglio D, Kotzias D, Larsen BR. *J. Chrom. A.* 1999; **854**: 207.
23. Limanto J, Desmond RA, Gauthier DRJr, Devine PN, Reamer RA, Volante RP. *Org. Lett.* 2003; **5**: 2271.
24. Sunner J, Nicol G, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1300.
25. Garnier E, Guillard J, Pasquinet E, Suzenet F, Poullain D, Jarry C, Léger J-M, Lebret B, Guillaumet G. *Org. Lett.* 2003; **5**: 4595.
26. Neunhoeffer H, in *Comprehensive heterocyclic chemistry II*. Katrizky AR, Rees CW, Scriven EFV (eds.), Pergamon Press, Oxford, UK, 1996, chap. 6.11, pp. 507–573.
27. Bernhardt PV, Hayes EJ. *Inorg. Chem.* 1998; **37**: 4214.

9.2. Conclusões.

Na investigação das reacções da aminoguanidina com os α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos seleccionados, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa de electrospray, e tendo em consideração o tipo de produtos de reacção formados, verificou-se a existência de diferentes tipos de reactividade para a aminoguanidina, no que respeita aos dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos seleccionados. Em termos da informação reunida através das experiências MSⁿ realizadas, para os iões de interesse, identificados nos espectros de massa ESI, verificou-se a existência de comportamentos de fragmentação específicos, dentro de cada classe de iões precursores fragmentados. Em cada classe de compostos identificados, constatou-se que a fragmentação das formas mais desidratadas de compostos precursores inclui a perda de espécies que parecem provir da fragmentação de espécies iónicas heterocíclicas. As referidas perdas constituem espécies que incluem parte do composto amina reagido, e inclusivé dos substituintes alquílicos da moléculas de dicarbonilo, com uma parte do composto de aminoguanidina reagido, à semelhança do que fora observado na fragmentação de espécies iónicas precursoras mais desidratadas, detectadas nos sistemas reaccionais da guanidina por ESI-MS. Também em semelhança com os sistemas reacionais, abordados nos capítulos anteriores, dentro de cada classe de iões de interesse detectados, no espectro de massa ESI, a massa das espécies difere em 18 Da, o que justifica a consequente desidratação das espécies detectadas, ao nível do espectro de massa ESI, para além do facto dos perfis de fragmentação de espécies iónicas mais desidratadas justificarem o ganho de estabilidade das formas mais desidratadas face às formas iónicas menos desidratadas detectadas.

Com base em considerações realizadas sobre o comportamento das reacções da aminoguanidina, constatou-se que as reacções em causa são, na verdade, bastante complexas, o que pode ser entendido face ao tipo de produtos de reacção identificados. Nas reacções da aminoguanidina foram identificados compostos de triazina, e possíveis compostos precursores, como tetrahidrotriazinas e tetrahidrotriazinas – H₂O. Na literatura existe evidência para a formação de compostos de triazina em solução, para as reacções do composto de aminoguanidina com dicarbonilos aldeídicos estudados no presente trabalho, i.e. glioxal, metilglioxal e diacetil [10,13]. Relativamente às formas precursoras dos compostos de triazina, existe apenas evidência, na literatura, para a formação de compostos de hidrazona [14], que constituem por espécies intermediárias com estruturas não cíclicas, em comparação com os compostos heterocíclicos de

tetrahidrotriazina e tetrahidrotriazina – H_2O . A formação destes intermediários de hidrazona compreende a reactividade do átomo de azoto do grupo hidrazina, na molécula de aminoguanidina, com uma molécula de dicarbonilo. A formação deste intermediário pode, por conseguinte, conduzir à formação de produtos de reacção (triazinas) isómericos. Depreende-se, assim, que a reacção de formação da triazina, que inclui a formação de intermediários do tipo hidrazona, pode resultar num processo reaccional regioselectivo [14]. Aliás, Limanto et al., identificaram este comportamento, na reacção da aminoguanidina com α -halo carbonilos, observando a formação de compostos de hidrazona, e, consequentemente, de isómeros de triazina [14]. Estes autores, determinaram ainda que a formação dos intermediários de hidrazona, na reacção de formação da triazina, pode estar dependente da diferença energética dos centros electrofílicos das moléculas de α -halo carbonilo reagidas [14]. Assim, quanto maior a diferença energética entre os referidos centros electrofílicos mais favorável é a formação de intermediários hidrazona. É de notar que os compostos de α -dicarbonilo, à semelhança dos compostos de α -halo carbonilo, possuem dois centros electrofílicos para reacção. No estudo que se apresenta neste capítulo, e com base nos resultados obtidos na fase gasosa, não se verificou, a perda de CH_2N_4 , na fragmentação de espécies precursoras das triazinas, para o sistema do dicarbonilo metilglioxal. Esta perda é característica da fragmentação de compostos heterocíclicos, e não de compostos que existam quer na forma não cíclica quer na de cadeia aberta (e.g. hidrazonas). Deste modo, para o sistema do dicarbonilo metilglioxal, existe a possibilidade de espécies precursoras de triazinas existirem na forma de cadeia aberta (hidrazonas), podendo estas existir em equilíbrio com correspondentes formas cíclicas. No caso do dicarbonilo 1-fenilo-1,2-propanodiona, observou-se uma elevada abundância relativa para formas precursoras de triazina, no espectro de massa ESI, em comparação com os restantes sistemas de dicarbonilos estudados. Esta situação deve-se certamente à formação de intermediários hidrazona relativamente estáveis, para o sistema 1-fenilo-1,2-propanodiona, em comparação com os restantes sistemas de dicarbonilos. Esta ocorrência é também suportada pela perspectiva mecanística de Limanto et al. [14], pois moléculas de dicarbonilo com centros electrofílicos possuindo energéticas muito distintas, devem preferencialmente conduzir à formação de intermediários hidrazona estáveis. Na verdade, a molécula do dicarbonilo 1-fenilo-1,2-propanodiona compreende dois centros electrofílicos com uma grande diferença energética, em comparação com as moléculas dos restantes dicarbonilos usadas no presente estudo. De uma forma geral,

auxiliando os resultados obtidos na fase gasosa, quer em termos da respectiva identificação e caracterização por ESI-MS(/MS) quer em termos das características espectrais ESI-MS, e juntamente com as propostas mecanísticas existentes na literatura, fora possível aceder a características reaccionais específicas para os sistemas reaccionais em questão, como é o caso da regioselectividade.

Nas reacções da aminoguanidina foram ainda identificados outros tipos de compostos, incluindo os compostos resultantes da possível reacção das formas de tetrahydrotriazina e de triazina com uma molécula de dicarbonilo. Estes compostos são compostos bicíclicos, contendo um anel de triazina e um outro de imidazolidina, no centro reactivo aminoguanidina. À partida, por observação das estruturas propostas para os compostos de tetrahydrotriazina e de triazina, verifica-se que não existe tendência para estas duas formas, em particular a triazina, reagirem com uma molécula de dicarbonilo, para a formação de um anel de imidazolidina conjugado. Na literatura fora reportada a existência de uma forte redistribuição da densidade electrónica π para a molécula de aminoguanidina, mais forte até que a constatada para a molécula de guanidina [15]. Com base nesta informação, torna-se possível perceber a tendência das formas de tetrahydrotriazina e de triazina para reagirem com uma molécula de dicarbonilo, para a formação de compostos com estruturas bicíclicas. Existe uma tendência favorável de que os compostos bicíclicos identificados, nas reacções da aminoguanidina, possam existir em solução, uma vez que foram também identificados nas reacções de uma triazina específica. É sabido que a reactividade das triazinas (aminotriazinas) compreende a formação de compostos policíclicos, os quais têm suscitado um particular interesse na comunidade científica, dadas as características pouco usuais e atractivas das triazinas (reactividade e interacção) [16,17]. Esses interesses recaem também a nível da química supramolecular [16,17]. Relativamente ao presente estudo, existe evidência na literatura para a formação de dihidroxiimidazolidina-triazinas, para a reacção de triazinas substituídas com glioxal, em particular [18]. Todavia, na literatura não fora possível o isolamento de dihidroxiimidazolidina-triazinas, para o sistema reaccional mencionado [18]. Fora, porém, possível constatar, que os compostos de dihidroxiimidazolidina-triazina, e correspondente forma desidratada, são na verdade bastante instáveis, sendo por isso difícil a sua detecção na reacção de triazinas substituídas com glioxal [18]. No presente estudo, também não fora possível a identificação dos compostos de dihidroxiimidazolidina-triazina, e da correspondente forma desidratada, para a reacção

da aminoguanidina/triazina seleccionada, com o glioxal, o que se revela concordante com os resultados da literatura [18]. Todavia, para os restantes sistemas de reacções estudados, em particular para os sistemas dos dicarbonilos dicetónicos, fora possível a identificação de dihidroxiimidazolidina-triazina e da sua forma desidratada, muito devido à sua maior estabilidade, e também à formação significativa de triazinas nestes sistemas reaccionais (reacção da aminoguanidina), em comparação com os sistemas dos dicarbonilos aldeídicos, glioxal e metilglioxal. Assim sendo, a proposta mecanística existente na literatura [18], para a formação de dihidroimidazotriazinas via dihidroxiimidazolidina-triazinas, é suportada pelos resultados obtidos no presente estudo, dado o facto de formas de dihidroxiimidazolidina-triazinas poderem ser produzidas nas reacções da aminoguanidina/triazina seleccionada com α -dicarbonilos.

Em comparação com sistemas de reacções dos compostos de acetil-lisina, acetil-arginina e guanidina, a aminoguanidina parece ser um composto mais selectivo para os compostos de α -dicarbonilo, uma vez que apenas formas nativas dos α -dicarbonilos reagem com o composto aminoguanidina. De acrescentar que mesmo ao nível da reacção da aminoguanidina com formas nativas dos α -dicarbonilos, pode existir selectividade, o que transfere, de facto, um acréscimo de selectividade para o composto aminoguanidina. Esta observação pode, também, ter um peso considerável na utilidade do composto aminoguanidina como captador de α -dicarbonilos em solução.

9.3. Bibliografia.

- [1] Schug KA, Lindner W. *Chem. Rev.* 2005; **105**: 67.
- [2] Warwood S, Mohammed S, Cristea IM, Evans C, Whetton AD, Gaskell SJ. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006; **20**: 3245.
- [3] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4451.
- [4] Yamashita M, Fenn JB. *J. Phys. Chem.* 1984; **88**: 4671.
- [5] Whitehouse CM, Dreyer RN, Yamashita M, Fenn JB. *Anal. Chem.* 1985; **57**: 675.
- [6] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov VN, Nikolaev VI, Pavlenko VA, Shkurov VA. *Dokl. Akad. Nauk SSSR.* 1984; **277**: 379.
- [7] Alexandrov ML, Gall LN, Krasnov MV, Nikolaev VI, Shkurov VA. *Zh. Anal. Khim.* 1985; **40**: 1272.
- [8] Hillenkamp F, Karas M, Beavis RC, Chait BT. *Anal. Chem.* 1991; **63**: 1193A.

- [9] Bier ME, Schwartz JC, em *Electrospray Ionization Mass Spectrometry*. Cole RB (ed.), John Wiley & Sons, Nova Iorque, 1997, cap. 7.
- [10] Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. *Biochem. J.* 1999; **344**: 109.
- [11] Monnier VM. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 1.
- [12] Thornalley PJ. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003; **419**: 31.
- [13] Erickson JG. *J. Am. Chem. Soc.* 1952; **74**: 4706.
- [14] Limanto J, Desmond RA, Gauthier DRJr, Devine PN, Reamer RA, Volante RP. *Org. Lett.* 2003; **5**: 2271.
- [15] Bharatam PV, Iqbal P, MaldeA, Tiwari R. *J. Phys. Chem. A.* 2004; **108**: 10509.
- [16] Neunhoeffer H, em *Comprehensive heterocyclic chemistry II*. Katrizky AR, Rees CW, Scriven EFV (eds.), Pergamon Press, Oxford, Reino Unido, 1996, cap. 6.11, pp. 507–573.
- [17] Bernhardt PV, Hayes EJ. *Inorg. Chem.* 1998; **37**: 4214.
- [18] Garnier E, Guillard J, Pasquinet E, Suzenet F, Poullain D, Jarry C, Léger J-M, Lebret B, Guillaumet G. *Org. Lett.* 2003; **5**: 4595.

10. Discussão geral, conclusões e perspectivas futuras.

O trabalho apresentado nesta dissertação respeita ao estudo das reacções dos aminoácidos modificados acetil-lisina e acetil-arginina, e de outros compostos amina relacionados, como guanidina e aminoguanidina, com um conjunto de α -dicarbonilos aldeídicos e dicetónicos, por aplicação de técnicas de espectrometria de massa de ionização por electrospray. A espectrometria de massa de ionização por electrospray usa um método de ionização relativamente “suave” capaz de transferir os iões, ou espécies pré-ionizadas, em solução para iões individuais na fase gasosa. Dadas as características atractivas da espectrometria de massa de ionização por electrospray, tem existido um crescente interesse no uso da técnica para o estudo de reacções em solução, através mesmo da análise directa de misturas reacionais pelos métodos convencionais ESI-MS *off-line* [1]. Esta situação é válida para misturas reacionais que não sejam relativamente complexas, e também para espécies de reagentes e de produtos de reacção que se encontrem na forma ionizada, ou numa forma pré-ionizada, em solução. Estes aspectos adequam-se perfeitamente aos sistemas reacionais dos compostos amina e dos compostos α -dicarbonilo seleccionados, uma vez que moléculas contendo grupos amina livres podem facilmente acomodar carga positiva, por protonação. Atendendo ao facto de se pretender obter informação do ponto de vista mecanístico para os sistemas reacionais em causa, não basta apenas considerar os resultados da identificação e da caracterização dos iões de interesse detectados no espectro de massa ESI; e que constituem os produtos de reacção formados. É necessário uma informação adicional relativa à formação dos produtos de reacção, como por exemplo informação sobre o comportamento cinético das reacções de formação dos produtos de reacção. Na verdade, não é possível aceder directamente por meio da informação espectral obtida, no conhecimento das abundâncias iónicas observadas para as moléculas protonadas dos reagentes e dos produtos de reacção, no referido espectro de massa ESI, à informação relativa aos aspectos cinéticos das reacções de formação dos produtos de reacção. Com efeito, as abundâncias relativas para um dado ião detectado, no espectro de massa ESI, não reflectem as quantidades dos respectivos iões em solução, pois para além do facto de se dever ter em conta que as abundâncias iónicas devem ser corrigidas atendendo aos efeitos de discriminação da razão massa/carga dos iões analisados [2], no espectrómetro de massa, é necessário atender ao processo de formação de iões na fase gasosa. Este

último aspecto foi objecto de uma investigação pormenorizada em especial no que respeita ao comportamento dos iões desde a solução a analisar em ESI-MS, incluindo o comportamento dos analitos nas condições usadas no espectrómetro de massa ESI, até à sua detecção. É de notar que, para o efeito, as soluções dos analitos seleccionados continham uma quantidade variável de tampão HEPES, no sentido de traduzir ao máximo o comportamento dos iões nas soluções das misturas reaccionais tamponadas analisadas, segundo as condições usadas em ESI-MS. De um ponto de vista geral, na análise das misturas reaccionais estudadas, por aplicação das técnicas de espectrometria de massa de electrospray, foi possível reunir informação sobre a natureza estrutural dos produtos de reacção formados e também sobre o comportamento cinético das reacções de formação dos referidos produtos de reacção. Assim, com esta informação tornou-se possível aceder a aspectos do mecanismo reaccional, que é um dos objectivos a atingir no presente trabalho de aplicação da espectrometria de massa à investigação sobre os processos reactivos Maillard.

Pode dizer-se de um modo geral que nas reacções dos compostos amina e dos compostos α -dicarbonilo estudados, foram observados varidíssimos iões de interesse, nos espectros de massa ESI, em que alguns iões que diferiam em 18 Da, e, sendo mais estruturalmente semelhantes, foram considerados como iões pertencentes a uma mesma classe. Os resultados das experiências MS^n ($n = 2$ e 3) realizadas, para os iões de interesse detectados no espectro de massa ESI, mostravam algumas semelhanças, no que respeita aos perfis de fragmentação. Relativamente ao conjunto de iões pertencentes a uma determinada classe, verificou-se ao nível das experiências MS^n que nas formas de iões não desidratadas a fragmentação ocorria preferencialmente ao nível do centro amina, com a libertação de neutros e formação de iões correspondentes aos reagentes de partida, ao passo que para formas de iões precursores mais desidratadas, e.g. a uma e a duas moléculas de água, a fragmentação ocorria sobretudo ao nível do resíduo do aminoácido modificado, no caso das reacções da acetil-arginina, ou ocorria de uma forma, em que não existiam perdas de neutros correspondentes a quaisquer dos reagentes, e sim de uma parte contendo os substituintes alquílicos das moléculas dos dicarbonilos reagidas e de uma outra parte contendo uma porção dos compostos amina reagidos. Tal ocorreu sobretudo para as reacções da guanidina e da aminoguanidina. Este último comportamento de fragmentação, para os sistemas dos compostos acetil-arginina, guanidina e aminoguanidina, revela-se com uma maior intensidade na fragmentação das formas dos iões precursores mais desidratadas. De uma forma geral,

nas reacções da acetil-arginina, guanidina e da aminoguanidina, constatou-se a formação de produtos de condensação directa dos centros amina reactivos com moléculas de α -dicarbonilo, e por vezes a condensação de produtos de reacção, que haviam sido formados, com moléculas dos reagentes ou com moléculas de produtos de reacção homólogos. Em relação ao sistema da acetil-lisina, verificou-se que na formação dos produtos de reacção identificados não existia uma condensação directa entre as moléculas dos reagentes, mas sim um processo de reacção mais complexo, com envolvimento do intermediário diimina para formação de iões de imidazólio, como se pode constatar na literatura [3,4]. Na fragmentação de iões detectados, para a reacção da acetil-lisina, verificou-se a ocorrência de perdas relativas aos resíduos de acetil-lisina, e muito ocasionalmente ao nível do anél de imidazólio formado. Tendo em consideração que iões pertencentes a uma mesma classe, no que respeita aos sistemas de reacções estudados, diferiam usualmente por 18 Da, como se observara nos espectros de massa ESI obtidos, a desidratação ocorrida ao nível dos iões precursores mostrava-se francamente concordante com o acréscimo de estabilidade observado quando da fragmentação de formas de iões precursores mais desidratadas. Outro aspecto interessante de referir, é o facto de que a fragmentação de formas dos iões precursores menos desidratados se mostrava, em geral, concordante com os processos de reacção previstos para os compostos detectados no espectro de massa ESI, o que equivale a dizer que os processos de reacção previstos e que as reacções de decomposição dos iões se mostravam bastantes semelhantes, em algumas situações. Deste modo, é possível deduzir que as variações energéticas envolvidas na formação dos produtos de reacção e as variações energéticas envolvidas no processo de decomposição dos iões precursores pode ser muito similar, pelo que em última análise se pode dizer que as variações das energias internas dos compostos em solução poderão aproximar-se das variações da energia dos iões na fase gasosa (i.e. na presença de uma pressão parcial significativa de um gás inerte (hélio) e sob a aplicação de voltagens rf apropriadas nos electrodos do analisador).

Relativamente aos sistemas reaccionais estudados, as reacções da acetil-lisina constituem sistemas reaccionais com características de algum modo distintas dos restantes sistemas de reacções estudados, i.e. da acetil-arginina, guanidina e da aminoguanidina. Esta distinção deve-se ao tipo de compostos formados e ao mecanismo de reacção envolvido. Assim, na reacção da acetil-lisina observou-se a formação de iões de imidazólio simples e substituídos, em particular para a reacção do composto amina

com os α -dicarbonilos aldeídicos glioal, metilglioal e fenilglioal. Para a reacção do mesmo composto amina com compostos α -dicarbonilo dicetónicos de maior cadeia alquílica e arílico estudados, não se observou a formação de quaisquer composto imidazólio. Tendo em consideração uma proposta mecanística existente na literatura [3,4], que inclui o envolvimento de um intermediário diimina para a formação do anel de imidazólio, verifica-se que na reacção de formação dos compostos imidazólio a reactividade do intermediário diimina formado é crucial, para a formação do anel de imidazólio. Neste caso, o intermediário diimina formado, na reacção de uma molécula de dicarbonilo com duas moléculas de acetil-lisina, reage com uma subsequente molécula de dicarbonilo, e unicamente ao nível do mesmo centro electrofílico da molécula de dicarbonilo anterior. Para isto acontecer torna-se necessário que não haja qualquer tipo de estabilização dos centros nucleofílicos na estrutura do intermediário diimina, e que na subsequente molécula de dicarbonilo reagida um dos centros electrofílicos tenha de ser forçosamente mais estável que o outro. Nestas condições, um dos centros nucleofílicos reage primeiramente com o centro electrofílico disponível na molécula de dicarbonilo, em que por consecutivos rearranjos, na forma hemiaminal formada, é renovado o centro electrofílico na molécula de dicarbonilo reagida, e desestabilizado o centro nucleofílico não reagido no intermediário diimina, resultando na formação do anel de imidazólio. Assim sendo, é possível concluir que se trata de um processo reacacional francamente selectivo, podendo ainda ser enfatizada a ausência de formação de compostos imidazólio, na reacção do composto de acetil-lisina com α -dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica, dado o facto das moléculas dos dicarbonilos dicetónicos não sofrerem facilmente hidratação, o que, por sua vez, não favorece a regeneração do centro electrofílico atacado na molécula de dicarbonilo, e consequentemente a reacção de formação do composto imidazólio. Ainda na reacção da acetil-lisina, para além da formação de compostos imidazólio simples, observou-se igualmente a formação de compostos imidazólio substituídos na posição 2 do anel de imidazólio, em particular para os sistemas de reacção dos dicarbonilos aldeídicos glioal, metilglioal e fenilglioal. Na formação destes compostos imidazólio substituídos, o intermediário diimina formado reage com as formas mono-hidratadas dos dicarbonilos, ao nível do grupo cetónico (sistemas dos dicarbonilos assimétricos metilglioal e fenilglioal, e ao nível do grupo aldeído (sistema do dicarbonilo glioal). Nestes casos, para os sistemas dos dicarbonilos assimétricos estudados, em particular, fora possível ao intermediário diimina formado reagir com um centro electrofílico

menos estabilizado, em relação com a formação dos compostos imidazólio simples, com consequente renovação do centro electrofílico atacado e estimulação do centro nucleofílico não reagido no intermediário diimina. No que respeita ao dicarbonilo glioxal, verificou-se que pode ou não ocorrer libertação da molécula de ácido fórmico, quando da reacção do intermediário diimina com a forma mono-hidratada do dicarbonilo glioxal, com formação dos compostos imidazólio simples e dos compostos imidazólio substituídos. Assim, na formação do composto imidazólio substituído, a regeneração do centro electrofílico é estabelecida por um processo diferente, no que respeita às reacções de formação das formas de imidazólio substituídas, para os sistemas dos dicarbonilos assimétricos referidos. Tendo em consideração as abundâncias iónicas dos compostos imidazólio e a reacção de formação do composto de imidazólio substituído para o sistema do glioxal, verifica-se que existe selectividade na reacção do intermediário diimina, para a formação dos compostos imidazólio, e que a reactividade deste intermediário está em grande medida condicionada pela disponibilidade de formas mono-hidratadas dos dicarbonilos em solução, e pela capacidade de regeneração do novo centro electrofílico carbonílico. Este depende da presença (ou ausência) de substituintes dadores de electrões no grupo diol das moléculas de dicarbonilo e dos rearranjos no sistema conjugado do intermediário diimina, responsável pelo aumento do carácter nucleofílico do átomo de azoto não reagido no intermediário. Em constraste com as reacções dos outros compostos amina estudados, na reactividade da acetil-lisina não se constata a importância da diferença energética dos dois centros electrofílicos na reactividade da molécula de dicarbonilo.

Nas reacções da acetil-arginina, observa-se inicialmente a formação de um produto inicial resultante da condensação da acetil-arginina com uma molécula de dicarbonilo, para todos os sistemas de compostos dicarbonilo estudados. A formação deste produto de condensação inicial, i.e. dihidroxiimidazolidina, é favorecida nas reacções dos dicarbonilos mais simétricos, como o glioxal e diacetil, em geral, devendo-se este aspecto ao facto da maior estabilidade dos centros electrofílicos, no caso da molécula de glioxal. A perda da equivalência energética dos centros electrofílicos na molécula de dihidroxiimidazolidina formada, por consequentes reacções de desidratação não é, por conseguinte, favorável [5]. No caso do dicarbonilo diacetil, dada a menor estabilidade dos centros electrofílicos na molécula de dicarbonilo, obtem-se a formação de formas mono- e di-hidratadas dos compostos dihidroxiimidazolidina, uma vez que a manutenção da equivalência energética dos centros electrofílicos não é tão relevante,

como no caso da reacção do glioxal. Para os sistemas dos dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica e arílico estudados, constata-se que a manutenção dos efeitos de equivalência energética dos centros electrofílicos na molécula de dihidroxiimidazolidina, provenientes da molécula de dicarbonilo reagida, deixa de ter qualquer relevância, sendo apenas importante a formação de espécies moleculares mais estáveis que as espécies precursoras. Porém, o que se observa é que as espécies mais estáveis, i.e. dihidroxiimidazolidina – 2H₂O, formadas na reacção dos dicarbonilos dicetónicos de maior cadeia alquílica, são, na verdade, bastante reactivas. Também ao nível das reacções da acetil-arginina, se tem a formação de produtos de reacção, relativos à condensação de uma molécula de acetil-arginina com duas moléculas de dicarbonilo, para a formação dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina). Este tipo de condensação ocorre sobretudo nas reacções da acetil-arginina com dicarbonilos dicetónicos. Na condensação de uma segunda molécula de dicarbonilo, ao nível do agregado de imidazolidina formado, no grupo arginil do aminoácido modificado, obtem-se o envolvimento do átomo de azoto mais nucleofílico (N_δ) [6]. A participação deste átomo de azoto mais nucleofílico, possibilita a formação de dois anéis de imidazolidina, no mesmo grupo arginil, o que contribui para o desenvolvimento de um impedimento esteroquímico no centro amina reagido. Os efeitos desta ocorrência são incrementados dada a presença do resíduo da acetil-arginina. Muito embora este efeito, o que se verifica é que as reacções ocorridas ao nível dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) contribuem para a minimização dos efeitos estereoquímicos acentuados no centro amina reagido, o que ainda acontece de uma forma selectiva, tendo em consideração as contribuições energéticas e estéricas do resíduo do aminoácido modificado. O processo reaccional envolvido nestas reacções traduz-se pela desidratação a uma molécula de água, que se compreende por um processo relativamente rápido, contribuindo para a observada formação do composto acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) mono-desidratado. Ao que parece, as reacções da acetil-arginina com dicarbonilos dicetónicos apresentam-se, ao nível das reacções dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), como sendo selectivas. É de referir que a minimização dos efeitos estereoquímicos nos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) formados, constitui uma fenomenologia bastante interessante, apresentando uma explicação prática para a compreensão da reversibilidade das reacções dos resíduos arginina com compostos dicarbonilo dicetónicos. Ainda nas reacções da acetil-arginina, verificou-se que o grupo arginil pode

reagir com formas mono-hidratadas dos dicarbonilos aldeídicos, em particular metilglioxal e fenilglioxal, no que respeita à formação dos compostos tetrahidropirimidina, e com intermediários dicarbonílicos formados nas soluções das misturas reaccionais, como por exemplo o intermediário envolvido na formação dos compostos argpirimidina [7]. Constatou-se efectivamente que a acetil-arginina reage com todo o tipo de formas de dicarbonilo presentes em solução, incluindo formas não hidratadas dos dicarbonilos, formas mono-hidratadas e intermediários dicarbonílicos formados. Em comparação com as reacções da acetil-lisina, que parece apenas reagir com formas mono-hidratadas dos dicarbonilos, as reacções da acetil-arginina não são específicas, salvo a excepção da reacção do composto amina com os compostos dicarbonilo simétricos (glioxal e diacetil). À semelhança do exposto na questão da selectividade da reacção da acetil-arginina com dicarbonilos dicetónicos, verificou-se que produtos de reacção formados nestes sistemas (i.e. acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H₂O), para os sistemas dos dicarbonilo dicetónicos de maior cadeia alquílica, em particular, também parecem reagir de forma selectiva. De facto apesar de reagirem com dicarbonilos, acetil-hidroimidazonas e outras formas homólogas, nas estruturas dos produtos de reacção resultantes, constatou-se que os substituintes alquílicos de maior cadeia carbonada se encontram localizados no mesmo lado das sequências de anéis de imidazolo desenvolvidas. Com estes resultados torna-se possível assumir que quando dois centros nucleofílicos do grupo arginil, possuindo uma energética semelhante, como os envolvidos na condensação inicial da acetil-arginina com os compostos dicarbonilo, atacam os centros electrofílicos nas moléculas de dicarbonilo, não existe selectividade nos processos reaccionais. Pelo contrário, quando dois centros nucleofílicos de energética diferente reagem, existe selectividade nos processos reaccionais envolvidos, quer pela contribuição do átomo de azoto mais nucleofílico do grupo arginil, quer pelos centros nucleofílicos dos produtos de reacção que tenham sido formados, e que contribuem para formação de entidades condensadas de ordem elevada.

É possível transportar as mesmas conclusões, estabelecidas para as reacções da acetil-arginina, embora com algumas reservas, para as reacções da guanidina com os dicarbonilos seleccionados. O facto de não se ter observado a formação do composto argpirimidina, nas reacções em causa, sugere que o composto guanidina é um reagente mais selectivo que o composto acetil-arginina, no que respeita aos sistemas dos dicarbonilos aldeídicos, em particular do metilglioxal. Como o composto guanidina não possui o resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina, existe uma perda de

selectividade das reacções da guanidina com dicarbonilos dicetónicos, embora ocorrendo igualmente minimização dos efeitos estereoquímicos dos agregados formados no centro amina, como se verificara nas reacções da acetil-arginina com o mesmo tipo de dicarbonilos. Também, na reactividade de produtos de reacção formados (i.e. dihidroxiimidazolidinas – $2\text{H}_2\text{O}$), fora observado a formação das mesmas entidades moleculares bastante condensadas, e os mesmos efeitos estruturais específicos na estrutura das espécies moleculares referidas, em comparação com o constatado para as reacções da acetil-arginina. Assim sendo, o aumento da reactividade do centro amina, na molécula de guanidina, face à molécula de acetil-arginina, parece indicar processos reaccionais semelhantes, com excepção, em particular, de um aumento de selectividade na reacção do dicarbonilo aldeídico metilglioxal e com uma perda de selectividade nas reacções dos dicarbonilos dicetónicos.

Nas reacções da aminoguanidina com os dicarbonilos seleccionados, observou-se a formação inicial de compostos tetrahydrotriazina e tetrahydrotriazina – H_2O , resultantes da condensação de uma molécula de aminoguanidina com uma molécula de dicarbonilo. Fora também observada a formação de compostos triazina. Para os sistemas dos dicarbonilos metilglioxal e 1-fenilo-1,2-propanodiona, em particular, os resultados obtidos na fase gasosa parecem indicar a formação de produtos de reacção não cíclicos (hidrazonas), na reacção de formação das triazinas, em comparação com os compostos cíclicos de tetrahydrotriazina e de tetrahydrotriazina – H_2O . A formação de hidrazonas conduz à formação de compostos triazina isoméricos, o que significa dizer que existe regioselectividade na reacção de formação das triazinas para os dicarbonilos metilglioxal e 1-fenilo-1,2-propanodiona. Os resultados de certo modo distintos para os estes últimos sistemas de dicarbonilos, em comparação com os restantes sistemas de dicarbonilos estudados, podem estar relacionados com considerações energéticas das moléculas de dicarbonilo reagidas, i.e. com a diferença energética dos centros electrofílicos nas moléculas de dicarbonilo reagidas [8]. Esta observação é suportada na literatura, para a reacção da aminoguanidina com α -halo carbonilos [8], possuindo estes últimos, em comparação com os compostos α -dicarbonilo, dois centros electrofílicos. A formação de intermediários de hidrazona, na reacção de formação das triazinas, para o sistema do dicarbonilo 1-fenilo-1,2-propanodiona, é suportada pelo facto da molécula do dicarbonilo em questão possuir dois electrófilos com uma energética muito distinta, mesmo em comparação com o que se pode verificar para os restantes dicarbonilos. Nas reacções da aminoguanidina verificou-se também a condensação de uma molécula de

aminoguanidina com duas moléculas de dicarbonilo, por intermédio da reacção de formas de tetrahydrotriazina e de triazina, em especial, com uma subsequente molécula de dicarbonilo. Numa primeira análise das estruturas dos compostos tetrahydrotriazina e triazina, não existe à partida tendência para os compostos reagirem com uma molécula de dicarbonilo subsequente, sobretudo no que respeita ao composto de triazina. Uma possível explicação para o facto destes dois últimos compostos heterocíclicos reagirem com uma molécula de dicarbonilo subsequente, pode ser atribuída ao facto de na molécula de aminoguanidina existir uma forte redistribuição da densidade electrónica π , mais forte até que a observada para a molécula de guanidina. Apesar destas espécies heterocíclicas reagirem com uma molécula de dicarbonilo, torna-se claro sublinhar que quanto mais desidratadas forem as formas dos compostos tetrahydrotriazina, menor será a sua tendência para reagir com uma subsequente molécula de dicarbonilo, dada a sua maior estabilidade. Deste modo, como na maioria dos sistemas de dicarbonilos estudados existe uma tendência para a formação de espécies mais desidratadas dos compostos tetrahydrotriazina inicialmente formados, é possível assumir que, numa perspectiva geral, existe uma menor tendência para a reacção de produtos de reacção formados com uma molécula de dicarbonilo subsequente. Esta ocorrência contraria a tendência observada nas reacções da acetil-arginina e da guanidina, em que as formas duplamente desidratadas, dos compostos dihidroxiimidazolidina inicialmente formados, reagem prontamente com subseqüentes moléculas de dicarbonilo, hidroimidazolonas e outras formas homólogas. É de referir que ao nível das reacções da aminoguanidina, existe apenas tendência do composto amina usado para reagir com formas não hidratadas dos dicarbonilos, incluindo os dicarbonilos aldeídicos, o que sugere que o composto aminoguanidina é o composto amina, estudado mais selectivo para as formas de dicarbonilos não hidratadas, sendo também estas últimas formas as mais reactivas. É interessante notar que o composto de aminoguanidina é também o menos reactivo dos compostos amina estudados. O composto aminoguanidina, sendo o mais selectivo na sua reacção com formas de dicarbonilo não desidratadas, dentro do conjunto de compostos amina estudados, sustenta a reconhecida aplicabilidade do composto na captação de formas de dicarbonilo não desidratadas. Atendendo aos valores de pK_a dos centros amina reactivos na estrutura dos compostos amina estudados, que reflectem de alguma forma a reactividade dos centros amina em solução, dada a capacidade de acomodar um protão e de estabilizar o desenvolvimento de carga positiva na molécula, verifica-se a seguinte ordem para os valores de pK_a ; aminoguanidina <

acetil-lisina < acetil-arginina \approx guanidina. Para a reactividade dos compostos amina estudados, verifica-se que a selectividade dos compostos amina segue a seguinte ordem: aminoguanidina > acetil-lisina > guanidina \approx acetil-arginina. Assim, sendo é possível concluir que quanto menor a reactividade do centro amina, maior é a selectividade do respectivo centro na sua reacção com as formas de dicarbonilo em solução.

Nas estruturas dos centros aminas estudados, incluindo a estrutura do intermediário diimina formado na reacção da acetil-lisina, verifica-se que os centros nucleofílicos, nas moléculas do intermediário diimina (i.e. reacção da acetil-lisina) e aminoguanidina, em particular, têm de uma energética superior, em comparação com os centros nucleofílicos nas moléculas de acetil-arginina e guanidina, sobretudo no que respeita aos centros nucleofílicos envolvidos na condensação inicial dos compostos amina com uma molécula de dicarbonilo. O facto de, nos sistemas dos compostos acetil-lisina e aminoguanidina, os centros nucleofílicos dos centros amina reactivos se encontrarem bastante desestabilizados, e de certo modo possuírem também uma energética diferente entre si, pode conduzir a um aumento da selectividade dos centros amina, e de algum modo reforçar a importância das contribuições energéticas dos reagentes (amina e dicarbonilo) na formação dos produtos de reacção. Também, nas reacções destes dois últimos compostos amina (acetil-lisina e aminoguanidina) se tem a preferência dos centros amina para com formas mono-hidratadas e formas não hidratadas dos dicarbonilos, respectivamente, parecendo, pois, existir alguma tendência dos centros amina para controlo dos processos de reacção em solução. Esta situação não se verifica, ou pelo menos não parece ser tão vincada, nas reacções dos compostos acetil-arginina e guanidina, em que nos sistemas dos dicarbonilos simétricos, sobretudo do glicoxal e do diacetil, os aspectos energéticos das moléculas de dicarbonilo parecem de certo modo ter uma influência marcada nos processos reactivos envolvidos, em particular face à manutenção dos aspectos de equivalência energética entre os dois centros electrofílicos nas estruturas dos compostos dihidroxiimidazolidina e de suas formas desidratadas. Relativamente ao comportamento das reacções dos compostos amina estudados, é possível destacar os seguintes aspectos, no âmbito do que se tem vindo a discutir neste capítulo:

✓ Os compostos amina seguem a seguinte ordem para o aumento da sua reactividade: aminoguanidina < acetil-lisina < acetil-arginina \approx guanidina.

- ✓ Os compostos amina seguem a seguinte ordem para o aumento da sua selectividade, na reacção com as formas de dicarbonilo em solução: aminoguanidina > acetil-lisina > guanidina \approx acetil-arginina.
- ✓ Quanto menos reactivo o centro amina, mais selectivo este parece ser, na sua reacção com os compostos dicarbonilo.
- ✓ Verifica-se um aumento da selectividade do composto amina, quando os processos de reacção envolvidos parecem ser controlados pela energética dos centros amina, em particular no que respeita aos compostos acetil-lisina e aminoguanidina.
- ✓ A perda de selectividade dos compostos amina parece estar relacionada com o aumento da influência dos aspectos da energética dos dicarbonilos, na formação de produtos de reacção. De citar em particular a manutenção da equivalência energética dos centros electrofilicos nas moléculas dos produtos de reacção quando da reacção dos compostos acetil-arginina e guanidina com dicarbonilos simétricos (glioxal e diacetil).
- ✓ Compostos amina com centros nucleofilicos menos estabilizados, e com uma diferença energética acentuada, são mais selectivos. Neste caso, tem-se a formação de produtos de reacção estáveis (sais de imidazólio e aminotriazinas).
- ✓ Compostos amina com centros nucleofilicos mais estabilizados, e com uma maior equivalência energética, são menos selectivos. Neste caso, tem-se a formação de produtos de reacção menos estáveis, que contribuem inclusivé para o desenvolvimento de espécies moleculares ainda mais condensadas.

No contexto da glicação ou do controlo e da inibição da glicação há ainda outras conclusões a estabelecer.

Nas reacções da acetil-lisina, atendendo à diversidade de compostos identificados, e aos aspectos da mecanística reaccional proposta, é possível enquadrar o comportamento das reacções nos processos de glicação, que envolvem, em particular, a reactividade dos resíduos de lisina. Nas reacções da acetil-lisina, para além da formação dos compostos imidazólio simples e substituídos, que se apresentam como

relativamente estáveis, observou-se a formação de um composto de imidazólio substituído e de um composto do tipo diazepina, para os sistemas do glioxal e do metilglioxal, respectivamente, apresentado os compostos tempos de vida relativamente curtos (i.e. < 1 dia). Se estes compostos imidazólio substituído e de diazepina sobreviverem nas condições *in vivo*, seria possível talvez estimar a extensão das modificações ocorridas nos resíduos de lisina, das proteínas. Efectivamente a determinação do mecanismo reaccional envolvido, para a reacção de compostos lisina modelo com compostos dicarbonilo, pode em muito auxiliar na compreensão das modificações ocorridas ao nível dos resíduos de lisina.

No caso das reacções da acetil-arginina, verificou-se a formação significativa do composto acetil-dihidroxiimidazolidina, para o dicarbonilo glioxal, e a formação do composto mais estável, acetil-hidroimidazolona, na reacção do metilglioxal. O primeiro resultado é concordante com os resultados obtidos por Glomb e Lang [4] e por Cotham et al. [9], e o segundo resultado é também concordante com a literatura [10–12]. Ainda em relação ao primeiro resultado, tem-se verificado na literatura uma menor importância atribuída aos compostos dihidroxiimidazolidina. No entanto, com os resultados obtidos por Glomb e Lang [4], em particular, para a elucidação do mecanismo envolvido na reacção de uma arginina modificada com glioxal, é possível prever um acréscimo de interesse na formação de compostos dihidroxiimidazolidina, devido em boa medida ao facto de serem por produtos de reacção reversível, o que de certo modo levanta alguma curiosidade sobre a modificação dos resíduos de arginina nas proteínas pelo glioxal, no que respeita ao seu papel e funcionalidade [9]. Na reacção da acetil-arginina com metilglioxal, foram pela primeira vez identificadas as formas hidratadas dos compostos argpirimidina, que se encontram perfeitamente previstas na reacção de formação do composto. Para o sistema do dicarbonilo fenilglioxal, observa-se a formação do composto argpirimidina, embora não tenham sido identificadas quaisquer formas hidratadas do composto referido, o que, na verdade, se explica pelo facto dos centros electrofílicos do intermediário dicarbonílico formado, para formação do composto de argpirimidina, se encontrarem muito mais estabilizados, que no caso do dicarbonilo metilglioxal. Ainda nas reacções da acetil-arginina, ao nível das experiências MSⁿ realizadas, para as moléculas protonadas de acetil-tetrahidropirimidina – H₂O (sistemas dos dicarbonilos metilglioxal e fenilglioxal), observou-se a formação de iões fragmento com as estruturas das moléculas protonadas de acetil-argpirimidina, acetil-hidroimidazolona, e acetil-5-metilimidazolona.

Curiosamente, este último ião, corresponde ao composto 5-metilimidazolona, que tem sido erroneamente mencionado na literatura [10,13]. Estudos em solução têm indicado que o composto argpirimidina é um produto de degradação do composto tetrahidropirimidina [6,12], e, de facto, as experiências na fase gasosa parecem confirmar este aspecto. Para finalizar, nas reacções da acetil-arginina com o metilglioal, em particular, identificou-se a formação do mesmo tipo de produtos de reacção, bem como em reacções semelhantes, como na modificação da proteína HSA com uma quantidade mínima de metilglioal *in vitro* [6]. Outro aspecto interessante nas reacções da acetil-arginina, que pode ser muito útil para elucidação das modificações reversíveis dos resíduos de arginina pelos dicarbonilos dicetónicos e também no contexto da glicação, prende-se com o tipo de modificações ocorridas ao nível dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) formados, envolvendo estes a formação e reactividade das formas dihemiaminal, à semelhança com os compostos acetil-dihidroxiimidazolidina. Estes compostos resultam, como fora referido anteriormente, da condensação de uma molécula de acetil-arginina com duas moléculas de dicarbonilo dicetónico. Tendo em consideração o grande impedimento estereoquímico proporcionado pelos anéis de imidazolidina formados, no grupo arginil, pode deduzir-se que o processo de desidratação a uma molécula contribui para minimização do impedimento estereoquímico desenvolvido, ao nível do grupo arginil do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina), ocorrendo também o processo de uma forma selectiva, i.e. no que respeita aos sistemas dos dicarbonilos mais simétricos e mais assimétricos. Tal acontece devido às influências energética/estérica do resíduo do aminoácido modificado acetil-arginina, nos agregados de imidazolidina formados no grupo arginil. Como o processo de desidratação a uma molécula de água se trata de um processo relativamente rápido, mais rápido que a desidratação a duas moléculas de água, e é responsável pela manutenção do anel bicíclico formado, na estrutura do composto de acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) – H₂O, sem que haja o envolvimento de outros processos de reacção, a reacção inversa da formação do composto pode facilmente ocorrer. Trata-se de uma reacção em que os grupos epóxido podem ser convertidos nas formas 1,2-diol em meio ligeiramente ácido ou básico. Na verdade, as modificações ocorridas na classe dos compostos acetil-bis(dihidroxiimidazolidina) são interessantes, pois para além de elucidarem a natureza reversível das modificações dos resíduos de arginina, por reacção com dicarbonilos dicetónicos, podem ainda ter um destaque particular no contexto do controlo e da inibição da glicação. Esta última

observação é feita no sentido de que os dicarbonilos dicetónicos reagem mais rapidamente que os dicarbonilos fisiológicos glicoxal e metilglicoxal [14], podendo assim os primeiros serem usados na competição com os dicarbonilos fisiológicos, ao nível da modificação dos resíduos de arginina, com o favorecimento de que os dicarbonilos dicetónicos reagem mais prontamente com os resíduos de arginina e ainda pelo facto de estimularem a ocorrência de modificações completamente reversíveis nos referidos resíduos.

Em relação às reacções do composto guanidina, observou-se, em concordância com o constatado nas reacções da acetil-arginina, a formação significativa do composto de dihidroimidazolidina e do composto de hidroimidazolona estável, para os dicarbonilos glicoxal e metilglicoxal, respectivamente. Surpreendentemente, na reacção da guanidina com metilglicoxal, não se observou a formação do composto argpirimidina, que anteriormente tinha sido observado de um modo significativo na reacção da acetil-arginina com o mesmo dicarbonilo. Neste caso, concluiu-se que o composto guanidina em solução pode prevenir eficientemente a formação do composto argpirimidina, dado o facto da guanidina existir bastante associada em solução aquosa. Como as concentrações de guanidina usadas (i.e. 100 mM) são na verdade muito inferiores às concentrações do composto para promover a desnaturação de proteínas (i.e. ≥ 2 M) [15,16] poderia ser possível, por exemplo, adoptar esta metodologia para os sistemas biológicos. De notar ainda que uma concentração significativa de metilglicoxal foi usada no presente estudo, relativamente à concentração fisiológica do dicarbonilo [11].

Nas reacções da aminoguanidina, destaca-se o facto de compostos inicialmente formados, através da condensação de uma molécula de aminoguanidina com uma molécula de dicarbonilo (i.e. tetrahidrotriazinas e triazinas) poderem redistribuir a sua densidade electrónica deslocalizada [17], de modo a possibilitar a sua reacção com uma molécula de dicarbonilo subsequente. A aminoguanidina reage preferencialmente com formas nativas dos compostos α -dicarbonilo, sendo, na verdade, dos compostos amina estudados que apresentam uma maior selectividade na sua reacção com os α -dicarbonilos seleccionados.

Apesar do elevado número de resultados obtidos, no que respeita ao comportamento das reacções dos compostos amina com α -dicarbonilos e sobre o mecanismo envolvido em electrospray, seria proveitoso investigar, talvez com maior profundidade, o efeito da adição de sais em solução na resposta dos analitos segundo as

condições usadas em ESI-MS, bem como uma possível extensão da gama linear dinâmica para concentrações superiores a 10^{-5} M, como indicado no capítulo V. No trabalho realizado foi determinado que o uso de concentrações elevadas de electrólito, nas soluções de analito, pode efectivamente conduzir a um aumento do sinal do ião analito, no espectro de massa ESI, ocorrendo este aumento para soluções de analito mais concentradas (i.e. $> 10^{-5}$ M). Assim, seria interessante investigar a utilidade analítica da espectrometria de massa ESI para a análise de soluções de analito com concentrações superiores a 10^{-5} M, bem como de interpretar a contribuição da actividade superficial de espécies, possuindo, também, um comportamento de electrólito em solução. Nesta perspectiva quem sabe se num futuro próximo será viável a obtenção de informação quantitativa fidedigna por recurso a técnicas de espectrometria de massa ESI *off-line*, mesmo no que respeita à análise de soluções com vários tipos de complexidade.

Em relação às reacções dos compostos amina com os compostos α -dicarbonilo, seria vantajoso estudar estas reacções em condições experimentais mais alargadas, que as utilizadas neste estudo, de modo a reunir um conjunto maior de informação mecanística para as reacções, e a poder, de uma forma mais segura, determinar-se a importância fisiológica das reacções de compostos amina e de α -dicarbonilo representativos dos meios fisiológicos. Muito embora as técnicas de espectrometria de massa utilizadas neste trabalho tenham fornecido boas indicações sobre os aspectos estruturais de reagentes e de produtos de reacção formados, e também do ponto de vista cinético das reacções que os incluem, seria interessante a comparação dos resultados obtidos com os resultados obtidos por recurso a outras técnicas de espectrometria de massa, como, por exemplo, FT-ICR, ou até mesmo de métodos cromatográficos adequados, para a análise das misturas reaccionais, com detecção por espectrometria de massa. Tendo em conta as considerações energéticas dos reagentes e dos produtos de reacção identificados, em termos do seu auxílio na interpretação dos aspectos da mecanística das reacções, seria interessante determinar se estas considerações têm com efeito uma contribuição importante, como no caso de se constituírem como coordenadas reaccionais, e, de uma forma geral, investigar como determinados factores podem intersectar o mecanismo reacional, e fornecer interpretação para um conjunto significativo de sistemas reaccionais considerados.

Bibliografia.

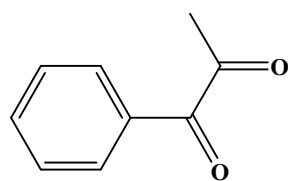
- [1] Santos LS, Knaack L, Metzger JO. *Int. J. Mass Spectrom.* 2005; **246**: 84. (e referências incluídas)
- [2] Sunner J, Nicol G, Kebarle P. *Anal. Chem.* 1988; **60**: 1300.
- [3] Kevin J, Wells-Knecht KJ, Brinkmann-Frye E, Baynes JW. *J. Org. Chem.* 1995; **60**: 6246.
- [4] Brinkmann-Frye E, Wells-Knecht KJ, Thorpe SR, Baynes JW. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* 1995; (22): 2817.
- [5] Glomb M, Lang G. *J. Agric. Food Chem.* 2001; **49**: 1493.
- [6] Ahmed N, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **364**: 15.
- [7] Shipanova IN, Glomb MA, Nagaraj RH. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; **344**: 29.
- [8] Limanto J, Desmond RA, Gauthier DRJr, Devine PN, Reamer RA, Volante RP. *Org. Lett.* 2003; **5**: 2271.
- [9] Cotham WE, Metz TO, Ferguson PL, Brock JWC, Hinton DJS, Thorpe SR, Baynes JW, Ames JM. *Mol. & Cell. Proteomics.* 2004; **3**: 1145.
- [10] Henle T, Walter AW, Haessner R, Klostermeyer H. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1994; **199**: 55.
- [11] Lo TWC, Westwood ME, McLellan AC, Selwood T, Thornalley PJ. *J. Biol. Chem.* 1994; **269**: 32299.
- [12] Ahmed N, Argirov OK, Minhas HS, Cordeiro CAA, Thornalley PJ. *Biochem. J.* 2002; **264**: 1.
- [13] Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K. *J. Biol. Chem.* 1999; **274**: 18492.
- [14] Saraiva MA, Borges CM, Florêncio MH. *J. Mass. Spectrom.* 2006; **41**: 755.
- [15] DeKoster GT, Robertson AD. *Biophys. Chem.* 1997; **64**: 59.
- [16] Baynes BM, Wang DIC, Trout BL. *Biochemistry.* 2005; **44**: 4919.
- [17] Bharatam PV, Iqbal P, MaldeA, Tiwari R. *J. Phys. Chem. A.* 2004; **108**: 10509.

Anexo.*Reacções da acetil-arginina com α -dicarbonilos dicetónicos.*

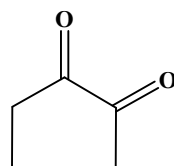
Nas reacções da acetil-arginina (AcArg) com os α -dicarbonilos dicetónicos (1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona) (Fig. A.1), e segundo a análise ESI-MS realizada, foram identificadas e caracterizadas estruturas de iões que correspondem às moléculas protonadas de produtos de reacção formados. Na Fig. A.2, apresentam-se os espectros de massa ESI obtidos para as misturas reaccionais da acetil-arginina com os dicarbonilos dicetónicos 1-fenil-1,2-propanodiona e 2,3-hexanodiona, em particular, para dois tempos de reacção distintos. As espécies iónicas identificadas, e as correspondentes abundâncias relativas, normalizadas às abundâncias do ião m/z 261 do tampão HEPES, encontram-se representadas nas Tabela A.1. As estruturas iónicas referidas (Tabela A.2) foram propostas com base na análise MSⁿ realizada, resultando na determinação de padrões de fragmentação (Tabela A.3) para os iões precursores de interesse (Tabela A.1).

É de notar que para os sistemas de reacções em causa apenas se apresentam os resultados relativos à identificação e caracterização de estruturas iónicas correspondentes a possíveis produtos de reacção mais condensados, uma vez que as restantes estruturas iónicas observadas, para os sistemas reaccionais em questão, foram abordadas no capítulo VII (secção 7.2). A acrescentar, os iões de interesse identificados, nas reacções da acetil-arginina com os dicarbonilo dicetónicos, foram agrupados em três classes (**m**, **n** e **o**), compreendendo cada classe definida os iões de interesse mais estruturalmente semelhantes.

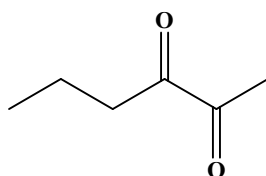
α -Dicarbonilos dicetônicos



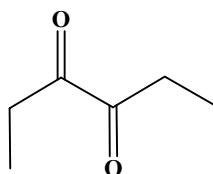
1-Fenil-1,2-propanodiona



2,3-Pentanodiona

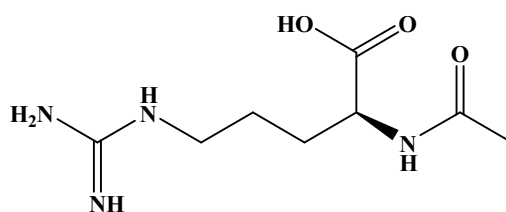


2,3-Hexanodiona



3,4-Hexanodiona

Amina



N_{α} -acetil-L-arginina

Figura A.1. Estruturas químicas dos compostos α -dicarbonilo e acetil-arginina (AcArg).

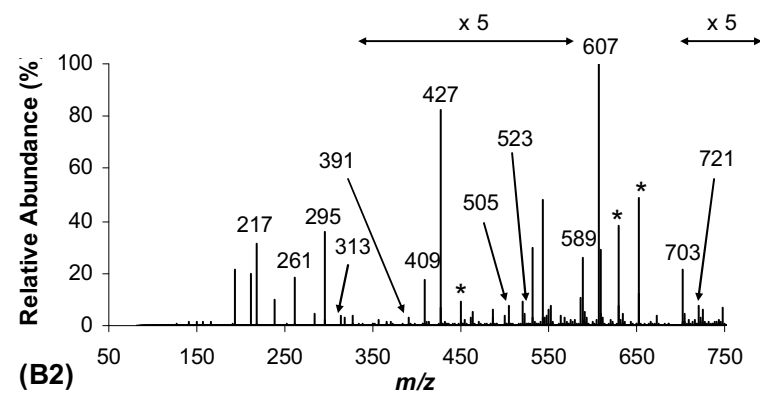
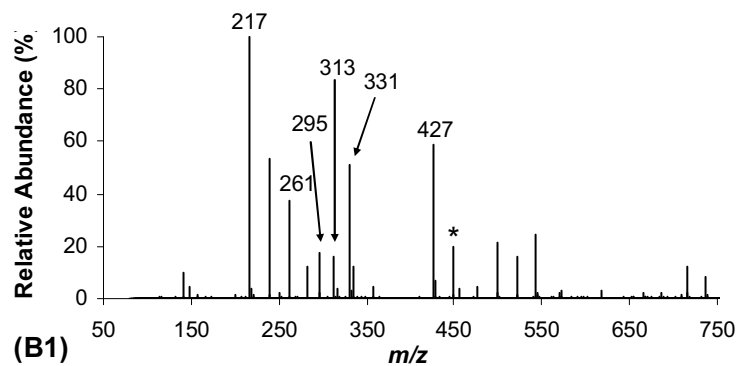
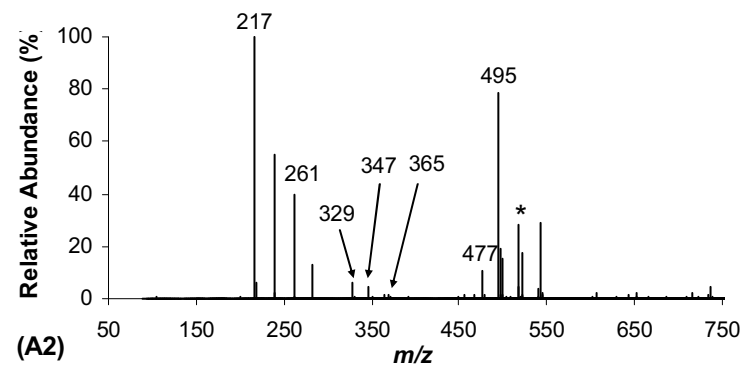
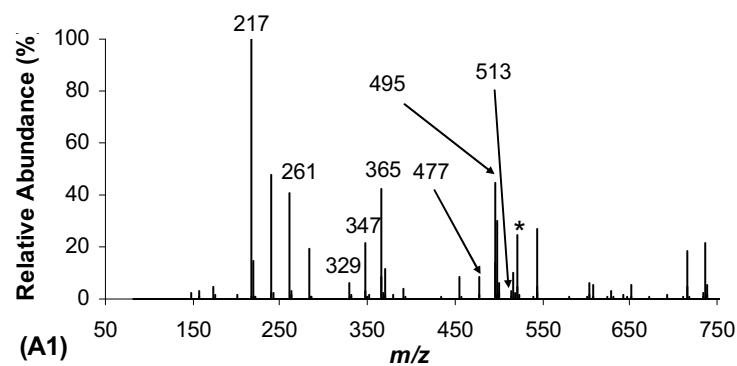


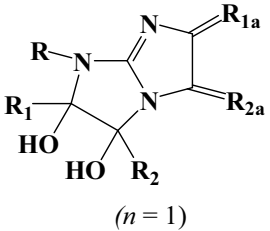
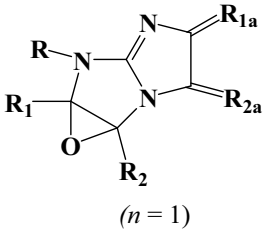
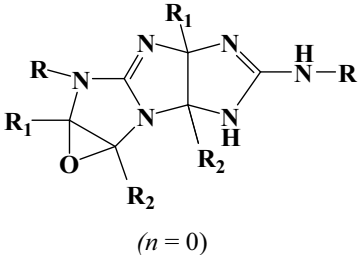
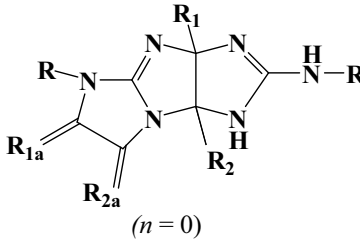
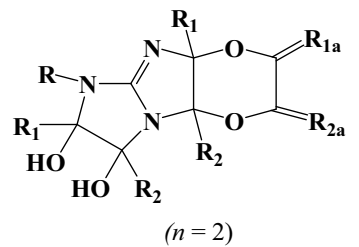
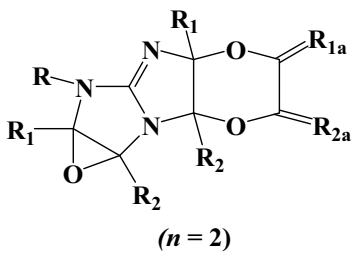
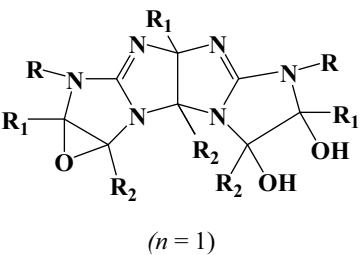
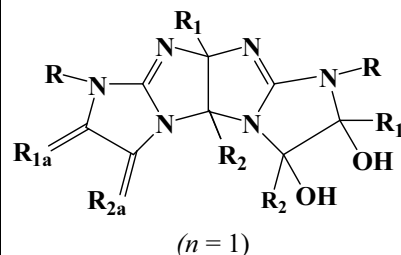
Figura A.2. Espectros ESI-MS obtidos para alíquotas de soluções das misturas reacionais 1-fenil-1,2-propanodiona (A) e 2,3-hexanodiona (B). **A1 e B1:** 5 min; **A2 e B2:** 1 dia. Os íões assinalados (*) referem-se a aductos mono e duplamente sodiados. O íão a m/z 261 corresponde à molécula protonada do composto tampão HEPES (sal de sódio).

Tabela A.1. Compostos identificados com base na análise por ESI-MS e suas abundâncias relativas, normalizadas, a dois tempos de reacção distintos; sistemas reaccionais 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona.

Iões de Interesse	Sistemas reaccionais (AcArg + 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona) m/z $[M + H]^+$ [Abund. relativa (%)]	
	1-Fenil-1,2-propanodiona	2,3-Pentanodiona
(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1m / 2m)	d	381 _{n=1} (1.8; ^a 3.6 ^b) / 481 _{n=2} (0.9; 2.6)
{(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n } – H ₂ O (3m / 4m)	d	363 _{n=1} (c; 0.5) / 463 _{n=2} (c; 3.6)
{(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + acetil-hidroimidazolona} + (dicarb) _n (1n / 2n)	d	579 _{n=0} (c; 92.2) / 679 _{n=1} (c; 6.5)
2(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1o / 2o)	d	561 _{n=0} (1.5; 4.8) / 661 _{n=1} (0.7; 16.6)
	2,3-hexanodiona	3,4-hexanodiona
(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1m / 2m)	409 _{n=1} (1.6; 19.4) / 523 _{n=2} (1.9; 5.0)	409 _{n=1} (32.0; 112) / 523 _{n=2} (10.3; 41.6)
{(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n } – H ₂ O (3m / 4m)	391 _{n=1} (0.6; 3.3) / 505 _{n=2} (c; 8.3)	391 _{n=1} (0.5; 5.4) / 505 _{n=2} (1.4; 228)
{(acetil-dihydroxyimidazolidina – 2H ₂ O) + acetil- hidroimidazolona} + (dicarb) _n (1n / 2n)	589 _{n=0} (c; 28.9) / 703 _{n=1} (0.5; 23.3)	589 _{n=0} (9.3; 167) / 703 _{n=1} (2.1; 335)
2(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarb) _n (1o / 2o)	607 _{n=0} (c; 555) / 721 _{n=1} (0.8; 8.3)	607 _{n=0} (c; 671) / 721 _{n=1} (c; 73.2)

Tempo de reacção ^a 5 min. ^b 1 dia. c Abundância iónica relativa < 0.5 %. d Iões não detectados. Dicarb refere-se a dicarbonilo.
As abundâncias iónicas relativas encontram-se normalizadas ao ião a m/z 261 do composto tampão.

Tabela A.2. Estruturas iónicas propostas para os compostos de interesse, identificados nos espectros de massa ESI; iões **1m–2o** (Tabela A.1).

Sistemas Reaccionais	Estruturas Iónicas Possíveis ^a			
	(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarbonilo) _n [iões 1m (<i>n</i> = 1); iões 2m (<i>n</i> = 2)]	{(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarbonilo) _n } – H ₂ O [iões 3m (<i>n</i> = 1); iões 4m (<i>n</i> = 2)]	{(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + acetil-hidroimidazolona} + (dicarbonilo) _n [iões 1n (<i>n</i> = 0); iões 2n (<i>n</i> = 1)]	2(acetil-dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarbonilo) _n [iões 1o (<i>n</i> = 0); iões 2o (<i>n</i> = 1)]
2,3-Pentanodiona / 2,3-Hexanodiona / 3,4-Hexanodiona	 (<i>n</i> = 1)	 (<i>n</i> = 1)	 (<i>n</i> = 0)	 (<i>n</i> = 0)
	 (<i>n</i> = 2)	 (<i>n</i> = 2)	 (<i>n</i> = 1)	 (<i>n</i> = 1)

^a As estruturas iónicas propostas referem-se a moléculas mono-protonadas, [M + H]⁺.

R = CH(COOH)(NHCOCH₃)(CH₂)₃.

R₁ = CH₃ (2,3-pentanodiona e 2,3-hexanodiona) e CH₂CH₃ (3,4-hexanodiona). R_{1a} = R₁ – H.

R₂ = CH₂CH₃ (2,3-pentanodiona e 3,4-hexanodiona) e CH₂CH₂CH₃ (2,3-hexanodiona). R_{2a} = R₂ – H.

Tabela A.3. Abundâncias relativas (%) dos iões fragmento (análise ESI-MS²), derivados dos iões precursores identificados nos espectros de massa ESI (Tabela A.1), para os sistemas reacionais 1-fenil-1,2-propanodiona, 2,3-pentanodiona, 2,3-hexanodiona e 3,4-hexanodiona.

Composição do ião fragmento	m/z (Ião Precursor: 1-Fenil-1,2-propanodiona / 2,3-Pentanodiona / 2,3-Hexanodiona / 3,4-Hexanodiona)			
	Abundância iónica relativa (%)			
	acetil- (dihidroxiimidazolidine – 2H ₂ O) + dicarbonilo (iões 1m) – / 381 / 409 / 409	acetil- {(dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + dicarbonilo} – H ₂ O (iões 3m) – / 363 / 391 / –	acetil- (dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarbonilo) ₂ (iões 2m) – / 481 / 523 / 523	acetil- {(dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + (dicarbonilo) ₂ } – H ₂ O (iões 4m) – / 463 / 505 / 505
[M + H – H ₂ O] ⁺	– / 100 / 100 / 100	– / 100 / 100 / –	– / 100 / 100 / 100	– / 100 / 40,0 / 35,3
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	– / 1,0 / 6,1 / 4,8	–	– / 2,6 / 3,0 / 3,3	– / – / 0,9 / –
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ N ₂] ⁺	– / 2,6 / 6,3 / 7,3	– / 6,1 / 2,7 / –	–	– / 0,5 / 2,5 / 0,5
[(M + H – H ₂ O) – C ₃ H ₄ O] ⁺	– / 1,6 / – / –	–	–	– / – / – / 5,8
[(M + H – H ₂ O) – C ₄ H ₆ O] ⁺	– / – / 3,7 / –	– / – / 1,7 / –	–	–
[(M + H – H ₂ O) – 155] ⁺	– / – / 0,5 / –	– / 8,3 / – / –	–	–
[M + H – CO] ⁺	– / – / – / 4,6	–	–	– / – / 0,9 / 11,0
[M + H – C ₂ H ₄ O] ⁺	– / – / – / 2,4	–	–	– / 2,2 / 0,8 / –
[M + H – CH ₂ N ₂] ⁺	– / 6,7 / 10,3 / 12,9	– / 6,9 / 10,7 / –	– / – / – / 0,8	– / 1,9 / 3,9 / 1,2
[M + H – C ₃ H ₄ O] ⁺	– / 7,3 / – / –	– / 0,9 / – / –	–	– / – / – / 2,9
[M + H – C ₄ H ₆ O] ⁺	– / – / 7,0 / –	– / – / 9,5 / –	–	– / – / 2,8 / –
[M + H – C ₃ H ₆ O ₂] ⁺	–	–	–	– / – / 4,6 / –
[M + H – 2*C ₄ H ₆ O] ⁺	– / – / – / 1,7	–	–	– / – / 7,2 / –
[M + H – 2*C ₄ H ₆ O – CO] ⁺	–	–	–	– / – / 7,7 / –
[M + H – dicarb] ⁺	– / 9,7 / 59,6 / 98,2	–	– / 55,9 / 70,1 / 81,7	– / – / 1,9 / 0,6
[(M + H – dicarb) – H ₂ O] ⁺	– / – / 10,3 / 19,5	–	– / 0,7 / 1,4 / 2,3	–
[M + H – 154] ⁺	–	–	–	– / – / – / 37,5
[M + H – 154 – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / – / – / 1,1
[M + H – 154 – CO] ⁺	–	–	–	– / – / – / 24,1
[M + H – 154 – C ₄ H ₆ N ₂] ⁺	–	–	–	– / – / – / 4,4
[(M + H – dicarb) – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	– / – / 1,4 / 1,5	–	–	–
[(M + H – dicarb) – C ₂ H ₄ O] ⁺	– / – / – / 1,6	–	– / 1,6 / 3,4 / –	–
[(M + H – dicarb) – C ₃ H ₆ O] ⁺	–	–	– / – / – / 5,1	–
[M + H – dicarb – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	–	–	–	– / 54,2 / 100 / 100
[(M + H – dicarb – (dicarb – H ₂ O)) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / 2,3 / 11,0 / 8,2
[(M + H – dicarb – (dicarb – H ₂ O)) – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	–	–	–	– / – / 1,6 / 1,4
[(M + H – dicarb – (dicarb – H ₂ O)) – 105] ⁺	–	–	–	– / – / 3,4 / 3,2
[(M + H – dicarb) – 105] ⁺	– / – / 1,2 / 2,7	–	–	–
[M + H – 105] ⁺	– / 2,9 / 10,7 / 16,3	– / 13,7 / 9,5 / –	– / – / – / 0,7	– / 0,6 / 2,8 / 1,1
[M + H – 155] ⁺	– / 0,6 / – / –	–	–	–
[M + H – 2*dicarb] ⁺	–	–	– / 14,3 / 23,4 / 27,8	–
[(M + H – 2*dicarb) – H ₂ O] ⁺	–	–	– / – / 0,8 / 1,3	–

(continua)

Tabela A.3 (continuação).

Abundância iônica relativa (%)	<i>m/z</i> (Ião precursor: 1-Fenil-1,2-propanodiona / 2,3-Pentanodiona / 2,3-Hexanodiona / 3,4-Hexanodiona)			
	acetil- (dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + hidroimidazolona (iões 1n)	acetil- 2(dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) (iões 1o)	acetil- {(dihidroxiimidazolidine – 2H ₂ O) + hidroimidazolona} + dicarbonilo (iões 2n)	acetil- 2(dihidroxiimidazolidina – 2H ₂ O) + dicarbonilo (iões 2o)
Composição do íon fragmento	– / 579 / 607 / 607	– / 561 / 589 / 589	– / 679 / – / 721	– / 661 / – / 703
[M + H – H ₂ O] ⁺	– / 100 / 100 / 100	– / 28,6 / 13,0 / 13,6	– / 100 / – / 100	– / 100 / – / 100
[(M + H – H ₂ O) – H ₂ O] ⁺	– / 0,8 / 0,9 / 1,7	–	– / 0,8 / – / 1,7	– / 2,1 / – / 1,8
[(M + H – H ₂ O) – CH ₂ N ₂] ⁺	– / 19,7 / 21,2 / 26,6	– / 6,5 / 2,3 / 5,0	– / 6,8 / – / 5,5	– / 48,7 / – / 78,5
[(M + H – H ₂ O) – dicarb] ⁺	–	–	– / 2,7 / – / –	–
[(M + H – H ₂ O) – 254] ⁺	– / 1,4 / – / –	–	–	–
[(M + H – H ₂ O) – 266] ⁺	– / 1,1 / – / –	–	–	–
[(M + H – H ₂ O) – 268] ⁺	– / – / – / 1,5	–	–	–
[(M + H – H ₂ O) – 280] ⁺	– / – / – / 2,1	–	–	–
[M + H – (AcArg – NH ₃)] ⁺	– / 1,0 / 2,7 / 1,8	–	– / – / – / 1,4	–
[M + H – dicarb] ⁺	–	–	– / 1,1 / – / 1,0	– / 0,7 / – / 5,8
[M + H – AcArg] ⁺	– / 26,8 / 21,6 / 16,3	– / 0,8 / – / 0,7	– / 9,5 / – / 7,3	– / 1,8 / – / 0,7
[M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)] ⁺	– / – / 4,5 / –	– / 100 / 100 / 100	–	– / 63,6 / – / 50,0
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – H ₂ O] ⁺	–	– / 1,1 / 2,2 / 4,9	–	– / 2,6 / – / 3,7
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – H ₂ O – CH ₂ N ₂] ⁺	–	– / – / 0,6 / 1,4	–	–
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – 2H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / 0,9 / – / –
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – H ₂ O – C ₃ H ₄ O] ⁺	–	–	–	– / 1,3 / – / –
[M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O) – dicarb] ⁺	–	–	–	– / 36,7 / – / 32,5
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – dicarb) – H ₂ O] ⁺	–	–	–	– / 1,5 / – / –
[(M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O)) – 105] ⁺	–	– / – / 1,1 / 3,4	–	–
[M + H – (acetil-dihidroxiimid – 2H ₂ O) – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	– / – / 1,9 / 1,5	–	–	–
[M + H – acetil-hidroimid] ⁺	– / 20,1 / 23,6 / 13,8	–	– / 2,7 / – / 5,1	–
[(M + H – acetil-hidroimid) – H ₂ O] ⁺	–	–	– / – / – / 2,2	–
[M + H – acetil-hidroimid – (dicarb – H ₂ O)] ⁺	– / 6,2 / – / –	–	–	–
[(M + H – acetil-hidroimid) – dicarb] ⁺	–	–	– / – / – / 0,6	–
[M + H – 174] ⁺	– / 16,4 / 13,0 / 18,9	–	– / 3,2 / – / 5,6	–
[M + H – 254] ⁺	–	– / 8,9 / 2,3 / –	–	– / 2,3 / – / –
[M + H – 268] ⁺	–	– / – / – / 20,0	–	– / – / – / 8,2
[M + H – 266] ⁺	–	– / 2,1 / 3,3 / –	–	– / 0,7 / – / –
[M + H – 280] ⁺	–	– / – / – / 17,2	–	– / – / – / 0,5
[M + H – 306] ⁺	–	– / 0,7 / – / –	–	–
[M + H – 320] ⁺	–	–	–	– / – / – / 1,0
[M + H – dicarb – C ₅ H ₆ O – acetil-hidroimid] ⁺	–	–	– / 1,0 / – / –	–

– Não detectado. Dicarb, acetil-dihidroxiimid and acetil-hidroimid referem-se a dicarbonilo, acetil-dihidroxiimidazolidina e acetil-hidroimidazolona, respectivamente.

As perdas de 105, 154, 155, 174, 254 (97 + 157), 266 (109 + 157), 268 (111 + 157), 280 (123 + 157), 306 (149 + 157) e 320 (169 + 157) Da correspondem aos seguintes resíduos iónicos $C_3H_7O_3N$,..., $C_7H_9O_3N$, ..., $C_{11}H_{18}O_3N_4$ ($C_4H_7N_3 + C_7H_{11}O_3N$), $C_{12}H_{18}O_3N_4$ ($C_5H_7N_3 + C_7H_{11}O_3N$), $C_{12}H_{20}O_3N_4$ ($C_5H_9N_3 + C_7H_{11}O_3N$), $C_{13}H_{20}O_3N_4$ ($C_6H_9N_3 + C_7H_{11}O_3N$), $C_{13}H_{18}O_3N_6$ ($C_6H_7N_5 + C_7H_{11}O_3N$) e $C_{14}H_{20}O_3N_6$ ($C_7H_9N_5 + C_7H_{11}O_3N$), respectivamente.

Com se mencionara no capítulo VII (secção 7.2), alguns dos iões identificados, nas misturas reaccionais da acetil-arginina com os dicarbonilos dicetónicos seleccionados, resultam da possível condensação de produtos de reacção que tenham sido formados, com moléculas de dicarbonilo, hidroimidazolona e de entidades homólogas, como dihidroxiimidazolidina – H₂O.

As conclusões estabelecidas no capítulo VIII, no que respeita às espécies iónicas identificadas nas misturas reaccionais da guanidina, e estruturalmente semelhantes com as identificadas nas reacções da acetil-arginina com o mesmo conjunto de dicarbonilos, podem ser francamente transportadas para os sistemas da acetil-arginina, isto em relação aos padrões de fragmentação dos iões de interesse, natureza estrutural dos iões identificados, e até mesmo em relação à respectivas variações das abundâncias iónicas no espectro de massa ESI.